

ANNEE 2021 THESE : 2021 – TOU 3 – 4043

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'IMMUNOCYTOCHIMIE POUR L'AIDE AU DIAGNOSTIC CYTOLOGIQUE DES NEOPLASIES CHEZ LE CHIEN ET LE CHAT

THESE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Charline FAUQUET

Née le 03/12/1996 à CLERMONT-FERRAND (63)

Directrice de thèse : Mme Nathalie BOURGES ABELLA

JURY

PRESIDENTE :
Mme Monique COURTADE SAÏDI

Professeure à l'IUC ONCOPÔLE de TOULOUSE

ASSESSEURS :

Mme Nathalie BOURGES ABELLA
Mme Fanny GRANAT

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie – Thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et Économie de la santé animale*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie- Bactériologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie – Analgésie*
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

CHARGES D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- Mme **CHARTIER Camille**, *Nouveaux animaux de compagnie*
M. **FERCHIOU Ahmed**, *Economie, production animale*
Mme **MANTELLI Morgane**, *Médecine interne*
Mme **MAURIN Claire**, *Nouveau animaux de compagnie*
Mme **TOUSSAINT Marion**, *Pathologie des équidés*

ENSEIGNANTS DE PREMIERE ANNEE COMMUNE AUX ETUDES VETERINAIRES

- M. **AUFFRET Jérémy**, *Physique-Chimie*
Mme **GAUCHARD Cécile**, *Biologie-écologie-santé*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- M. **BESSIERE Pierre**, *Microbiologie infectiologie*
Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*
M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

REMERCIEMENTS

A Madame la Professeure Monique COURTADE-SAÏDI

Professeur à l'Université Paul Sabatier

Praticien Hospitalier

Histologie – Embryologie

Qui nous a fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Hommages respectueux.

A Madame le Professeur Nathalie BOURGES-ABELLA

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Histologie – Anatomie Pathologique

Qui m'a fait l'honneur d'encadrer ce travail et m'a guidée tout au long de sa réalisation.
Pour ses conseils et pour le temps qu'elle m'a consacré.

Sincères remerciements.

A Madame le Docteur Fanny GRANAT

Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Biologie médicale animale

Qui me fait l'honneur d'être assesseur dans mon jury de thèse.

Qu'elle trouve ici ma sincère reconnaissance.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	11
PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
ETAT DES LIEUX DES PRATIQUES EN DIAGNOSTIC CYTOLOGIQUE SUR SPÉCIMENS SOLIDES DE NEOPLASIES CHEZ LE CARNIVORE DOMESTIQUE	13
1. TECHNIQUES DE PRELEVEMENT EN CYTOLOGIE	14
1.1. TECHNIQUE DE CYTOPONCTION A L'AIGUILLE FINE	14
1.1.1. Matériel nécessaire	14
1.1.2. Préparation du site d'aspiration	15
1.1.3. Procédure d'aspiration	15
1.1.4. Technique alternative : le prélèvement sans aspiration	16
1.1.5. Artefacts techniques	18
1.1.6. Techniques d'étalement sur lame	19
1.2. TECHNIQUE DE CALQUE PAR IMPRESSION	20
2. ROLE DE L'IMMUNOCYTOCHIMIE DANS LE DIAGNOSTIC DE TUMEURS CHEZ LES CARNIVORES DOMESTIQUES	23
2.1. PRINCIPE GENERAL DE L'IMMUNOCYTOCHIMIE	24
2.1.1. La préparation des spécimens en amont	24
2.1.2. Quelques particularités dans les étapes de la procédure immunocytochimique	27
2.2 INTERET DE L'IMMUNOCYTOCHIMIE EN DIAGNOSTIC CHEZ LE CHIEN ET LE CHAT	29
2.2.1. Avantages et inconvénients de l'immunocytochimie comparativement à la procédure immunohistochimique	29
2.2.2. Anticorps utilisés en immunocytochimie chez le chien et le chat	32
2.1.2.1. Le CD3	35
2.1.2.2. Le CD20	35
2.1.2.3. La Cytokératine	36
2.1.2.4. La Vimentine	37
PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE	39
1. OBJECTIFS	40

2. MATERIEL ET METHODES	40
2.1. SPECIMENS CYTOLOGIQUES	40
2.2. PROCEDURE EXPERIMENTALE	40
2.3. REALISATION ET STOCKAGE DES LAMES	41
2.4. ANTICORPS	41
2.4.1. Anticorps primaires	41
2.4.2. Anticorps secondaire	41
2.5. TECHNIQUE IMMUNOCYTOCHIMIQUE	41
2.5.1. Préparation des lames et fixation	43
2.5.2. Immunocytochimie	43
2.5.2.1. Étape 1 : Agent bloquant l'activité endogène de la peroxydase	44
2.5.2.2. Étape 2 : Procédure de blocage des protéines endogènes	44
2.5.2.3. Étape 3 : Anticorps primaires et réactifs du contrôle négatif	45
2.5.2.4. Étape 4 : Anticorps secondaire : Polymère couplé à la peroxydase	45
2.5.2.5. Étape 5 : Étape de révélation	45
2.5.2.6. Étape 6 : Contre-coloration nucléaire	46
2.6. LECTURE ET INTERPRETATION DES LAMES	46
2.6.1. Contrôle de la qualité des spécimens	46
2.6.2. Contrôle des témoins négatifs	46
2.6.3. Interprétation	47
3. RESULTATS	47
4. DISCUSSION	52

CONCLUSION	56
-------------------	-----------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	58
------------------------------------	-----------

ANNEXES	63
----------------	-----------

Annexe 1: Informations sur les animaux prélevés aux autopsies.	63
---	-----------

Annexe 2: Essais techniques réalisés aux étapes 1 et 3 sur les temps d'incubation des spécimens soumis à la technique d'immunocytochimie.	65
--	-----------

Annexe 3: Résultats généraux semi-qualitatif sur spécimens colorés au May-Grünwald Giemsa (MGG) et après réaction immunocytochimique utilisant des marqueurs de tissus épithéliaux (pan cytokeratine AE1/AE3), mésenchymateux (vimentine) et lymphoïdes (CD3 et CD20)	66
--	-----------

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1: Schématisation de la technique de cytoponction à l'aiguille fine [11].	16
Figure 2: Cytoponction réalisée dans une zone non représentative [11].	18
Figure 3: Schématisation de la technique d'étalement conventionnel sur lame d'un spécimen prélevé par cytoponction à l'aiguille fine [11].....	19
Figure 4: Schématisation de la technique d'étalement d'un frottis sanguin [11].	20
Figure 5: Photographie montrant la technique de calque par impression [25].....	21
Figure 6: Application du stylo Dako-Pen-Agilent sur la lame en verre.	43
Figure 7: Chambre humidifiée réalisée en utilisant une boîte de lames dont le fond est rempli d'eau.	44
Figure 9: Rate, chat (expression du CD3, x400): marquage cytoplasmique et membranaire des lymphocytes T.	49
Figure 8: Rate, chat (expression du CD3, x200) : marquage d'une population de cellules rondes à fort rapport nucléoplasmique évoquant des lymphocytes.	49
Figure 10: Nœud lymphatique, chien (expression du CD3, x400): marquage cytoplasmique et membranaire de lymphocytes.	49
Figure 11: Rate, chat (expression du CD20, x400): marquage d'une population de cellules rondes à fort rapport nucléoplasmique évoquant des lymphocytes.	50
Figure 13: Rate, chien (expression du CD20, x400): marquage cytoplasmique et membranaire de lymphocytes.....	50
Figure 12: Rate, chien (expression du CD20, x200): marquage d'une population de cellules rondes à fort rapport nucléoplasmique évoquant des lymphocytes.	50
Figure 14: Nœud lymphatique, chat (expression du CD20, x1000): marquage cytoplasmique et membranaire de lymphocytes.	50
Figure 15: Rate, chat (expression de la Vimentine, x200): marquage d'une population de cellules aux prolongements cytoplasmiques dendritiques semblant former un réseau et de quelques cellules rondes.....	51

Figure 16: Rate, chien (expression de la Vimentine, x200): marquage cytoplasmique d'une population de cellules fusiformes.....	51
Figure 17: Foie, chien (expression de la Vimentine, x400): marquage cytoplasmique de quelques cellules de morphologie dendritique à côté des hépatocytes.	51
Figure 18: Rate, chien (expression de la Vimentine, x400): marquage d'une population de cellules fusiformes aux prolongements cytoplasmiques effilé.	51
Figure 19: Foie, chien (expression de la Cytokératine AE1/AE3, x400): marquage cytoplasmique des hépatocytes.	52

TABLEAUX

Tableau 1 : Indications et caractéristiques des méthodes de prélèvement en cytologie. D'après [11].	22
Tableau 2: Anticorps actuellement utilisés en Immunocytochimie chez le chien et le chat, d'après Cowell et al. 2020 [11].	34
Tableau 3: Particularités des anticorps primaires.	41
Tableau 4: Les différentes étapes de la technique d'immunocytochimie avec les références des principaux réactifs.	42

INTRODUCTION

L'immunocytochimie est une technique déjà largement utilisée en médecine humaine pour apporter des informations complémentaires à la cytologie classique, et représente un outil précieux pour le diagnostic cytomorphologique.

En médecine vétérinaire, l'immunocytochimie tend à se développer, et commence à être utilisée en routine pour l'immunophénotypage de tumeurs chez les carnivores domestiques dans certains laboratoires centraux de biologie médicale vétérinaire. Elle permet d'établir le diagnostic précis de nombreux types tumoraux sans la lourdeur liée à la réalisation de biopsies ou de chirurgies plus invasives. Néanmoins, il n'existe pas encore de réelle standardisation des protocoles, et chaque laboratoire de biologie médicale vétérinaire doit réaliser ses propres essais afin d'obtenir un protocole optimisé [11][23][26][27][30][33].

L'objectif de cette étude est la mise au point technique de protocoles d'immunocytochimie pour l'aide au diagnostic cytologique des néoplasies chez le chien et le chat afin de les introduire en routine au sein du laboratoire central de biologie médicale de l'ENVT.

Nous nous sommes basés sur les protocoles d'immunocytochimie développés par l'équipe du Professeur de biologie médicale Rose Raskin de l'Université de Purdue (Etats-Unis) et nous avons limité notre étude à l'utilisation de marqueurs des tissus épithéliaux, mésenchymateux et lymphoïdes [26][27]. Pour ce faire, nous avons choisi quatre anticorps validés en immunocytochimie chez le chien et le chat: le CD3 comme marqueur des lymphocytes T, le CD20 comme marqueur des lymphocytes B, la cytokératine comme marqueur des tissus épithéliaux, et la vimentine comme marqueur des tissus mésenchymateux. L'objectif de ce travail expérimental était la mise au point technique d'un protocole d'immunocytochimie standardisé pouvant être utilisé en routine au Laboratoire Central de Biologie Médicale de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT).

La première partie de ce travail de thèse de médecine vétérinaire fait un point bibliographique sur les modalités de prélèvement en cytologie vétérinaire sur tissus

solides, et comparant les différences notables entre technique immunohistochimie et technique immunocytochimie. La deuxième et dernière partie est consacrée à l'étude expérimentale réalisée entre janvier et juillet 2021 au sein du Laboratoire Central de Biologie Médicale à partir de spécimens issus de cytoponctions de foies et rates et de calques par impression de nœuds lymphatiques réalisés sur des carnivores domestiques présentés aux cliniques d'autopsie de l'ENVT.

PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETAT DES LIEUX DES PRATIQUES EN DIAGNOSTIC CYTOLOGIQUE SUR SPÉCIMENS SOLIDES DE NEOPLASIES CHEZ LE CARNIVORE DOMESTIQUE

1. TECHNIQUES DE PRELEVEMENT EN CYTOLOGIE

Il existe différentes méthodes de prélèvement cytologique sur tissus solides ou liquides. Chaque technique a des indications particulières. Pour les tissus solides, la cytoponction à l'aiguille fine, avec ou sans aspiration, reste la méthode la plus couramment utilisée. Néanmoins, d'autres procédés existent, comme le calque par impression, le raclage, ou encore l'écouvillonnage.

Les techniques de prélèvement des spécimens liquides ne seront pas abordées dans ce travail.

1.1. Technique de cytoponction à l'aiguille fine

La technique de cytoponction à l'aiguille fine nécessite des aiguilles de faible diamètre, ce qui en fait une méthode non invasive et relativement peu douloureuse, facilement réalisable en pratique [11][18].

1.1.1. Matériel nécessaire

Il est nécessaire d'utiliser des aiguilles de 22 gauges (bleue) à 25 gauges (orange) et d'une seringue à piston avec embout caoutchouc de 2 à 10 mL. Plus le tissu est fin et plus l'aiguille utilisée doit être fine. Lorsque des aiguilles trop larges sont utilisées (< 22 G), la contamination sanguine est plus importante, et des fragments de tissus peuvent être aspirés, empêchant de récupérer seulement les cellules libres. C'est pourquoi il est conseillé d'utiliser également des aiguilles dont la taille n'excède pas 22G pour les tissus épais. Pour les très petites masses, une aiguille de 25G peut être utilisée. Pour le foie ou la rate, des aiguilles plus longues sont généralement nécessaires, en particulier chez les grands chiens [5][6][11][18].

La consistance des tissus va influencer le choix de capacité de la seringue. Des tissus tendres comme les nœuds lymphatiques peuvent être prélevés avec des seringues de 3mL, tandis que les tissus plus fermes comme les carcinomes à cellules squameuses nécessitent des seringues de plus grand volume afin de maintenir une pression négative

suffisante pendant toute la durée de l'aspiration et obtenir un nombre suffisant de cellules [11].

Afin d'améliorer la qualité des spécimens, l'ensemble du matériel (aiguilles, seringues, lames, ...) doit être présent à proximité du préleveur. Le spécimen cytologique pouvant rapidement coaguler dans l'aiguille et le matériel expulsé sur la lame pouvant sécher en quelques secondes, l'étape de préparation en amont permet de limiter les artefacts pré-analytiques [5][25].

Pour les personnes relativement inexpérimentées, il est possible d'aspirer de l'EDTA dans la garde de l'aiguille avant l'aspiration afin de réduire les artefacts de coagulation, causes fréquentes d'étalements cytologiques de mauvaise qualité [25].

1.1.2. Préparation du site d'aspiration

La zone de ponction doit être préparée chirurgicalement, comme lors d'une vaccination ou d'une ponction veineuse, en passant une compresse imbibée d'alcool sur le site d'intérêt.

Dans le cas des cytoponctions échoguidées, il est important de ne pas laisser de gel échographique sur le site de ponction car ce dernier est coloré en rose magenta par le May Grünwald Giemsa, ce qui peut nuire voire empêcher l'observation des cellules d'intérêt. Le mieux est donc de le remplacer par de l'alcool [6][11][25].

1.1.3. Procédure d'aspiration

Pour réaliser une cytoponction à l'aiguille fine, la zone à ponctionner est stabilisée avec une main, tandis que l'aiguille, montée sur une seringue, est introduite au centre de la zone à prélever avec la main dominante. Le piston de la seringue est ensuite tiré sur 0,5 à 1 mL afin de réaliser une pression négative. Cette opération est réalisée 3 à 5 fois (*Figure 1*). Des mouvements de va-et-vient d'avant en arrière avec l'aiguille sont possibles. Lorsque la zone à prélever est de taille importante, il est utile d'orienter l'aiguille dans différentes incidences ou directions, afin d'augmenter la quantité et la nature de tissu prélevé. Une alternative est d'effectuer les cytoponctions dans différentes

localisations de la masse, en réalisant une lame pour chaque zone cytoponctionnée. [5][6][11][18][25].

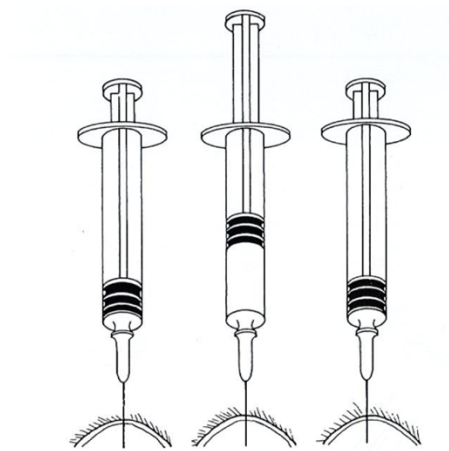


Figure 1: Schématisation de la technique de cytoponction à l'aiguille fine [11].

Après avoir aspiré dans plusieurs directions, la pression négative est relâchée et l'aiguille est retirée du tissu. Il faut faire attention à ne pas enlever l'aiguille du tissu lors de l'aspiration, car cela peut entraîner une contamination par les tissus voisins, ou encore une aspiration du spécimen dans la seringue, qui ne pourra plus être récupéré.

La pression négative appliquée en tirant sur le piston ne doit être mise en œuvre que quelques secondes. Le plus souvent, aucun matériel n'est visible dans la seringue ou dans la garde de l'aiguille, mais un spécimen de taille suffisante est observé sur la lame. Lorsque l'aspiration est appliquée trop longtemps ou avec trop de force, les vaisseaux sanguins peuvent être rompus et entraîner une hémodilution à l'origine d'examen non conclusif [11].

Enfin, afin de faciliter l'aspiration à pression négative, des pistolets d'aspiration sont commercialisés. Le piston de la seringue se trouve dans la gâchette, ce qui permet une rétraction plus facile et plus stable de celui-ci. Ces pistolets peuvent s'avérer utiles lors d'aspiration de masses ou d'organes difficiles à immobiliser car le vide peut être facilement maintenu avec une seule main [6][25].

1.1.4. Technique alternative : le prélèvement sans aspiration

Il est également possible de réaliser les cytoponctions à l'aiguille fine sans appliquer d'aspiration à pression négative. On parle alors de « prélèvement capillaire à

l'aiguille fine » ou encore de « fenestration à l'aiguille fine » [5][25]. Cette technique fonctionne très bien pour la plupart des tissus, notamment ceux qui sont richement vascularisés (foie, rate, reins, thyroïde) et permet d'obtenir des spécimens de qualité équivalente voire meilleure à la méthode avec aspiration [11][25].

Mis à part le fait que le piston n'est pas tiré, le procédé est exactement le même que précédemment. Cette technique est plus facile à réaliser, car il est plus aisé de piquer rapidement le tissu plusieurs fois que de maintenir l'aiguille dans la bonne trajectoire en tirant le piston en arrière et en le relâchant à maintes reprises [5].

La seringue peut être montée sur l'aiguille dès l'étape des ponctions de tissus pour gagner du temps, ou bien le prélèvement peut être réalisé seulement avec l'aiguille, qui est ensuite montée sur la seringue pour l'expulsion du matériel sur une lame. Dans ce cas, la seringue est remplie d'air au préalable afin d'expulser rapidement le contenu de l'aiguille et de limiter la coagulation du matériel cytoponctionné. Pour les zones d'intérêt de petite taille, la technique de fenestration avec l'aiguille seule permet de diminuer la distance entre la main dominante et le site de prélèvement, apportant ainsi une meilleure sensibilité. L'aiguille est déplacée rapidement d'avant en arrière 4 à 8 fois en essayant de rester dans la même orientation, ce qui permet de collecter les cellules détachées du reste du tissu par ces mouvements de va-et-vient. Si la zone à échantillonner est grande, l'aiguille peut être dirigée en éventail pendant les multiples fenestrations [5][6][11][25].

Afin d'augmenter les chances d'avoir des spécimens représentatifs, il est conseillé de réaliser plusieurs prélèvements sur différentes zones de tissu à analyser [5][11][18][25]. Comme pour la technique d'aspiration, il est important d'éviter que l'aiguille ne ressorte de la masse et ne soit contaminée par les tissus environnants. Les étapes d'étalement sur lame sont les mêmes que pour l'aspiration à l'aiguille fine (*Partie 1 : 1.1.6.*).

La technique d'aspiration à l'aiguille fine peut s'avérer intéressante dans les situations où la masse est extrêmement ferme et ne libère pas de cellules avec la technique sans aspiration. Dans ces cas, la force supplémentaire apportée par la pression négative peut décoller des cellules fermement attachées. De plus, si le tissu à prélever est enflammé ou douloureux, entrer dans la zone à prélever une seule fois en aspirant avec la seringue semblerait moins inconfortable pour l'animal [5].

La décision de réaliser des cytoponctions à l'aiguille fine avec ou sans aspiration est prise par l'opérateur individuellement pour chaque tissu [25].

1.1.5. Artefacts techniques

Les lames obtenues après cytoponction à l'aiguille fine peuvent parfois être non diagnostiques en raison d'une trop faible cellularité, souvent engendrée par des gestes techniques impropres :

- Cytoponction réalisée dans une zone saine : l'aiguille est insérée dans une région non représentative de la lésion (*Figure 2*). C'est souvent le cas chez les animaux obèses, chez lesquels la lésion peut être entourée d'un abondant tissu adipeux sous-cutané. Il arrive aussi que les cellules ne s'exfolient pas assez, ou soient rompues lors de l'étalement sur la lame [11].

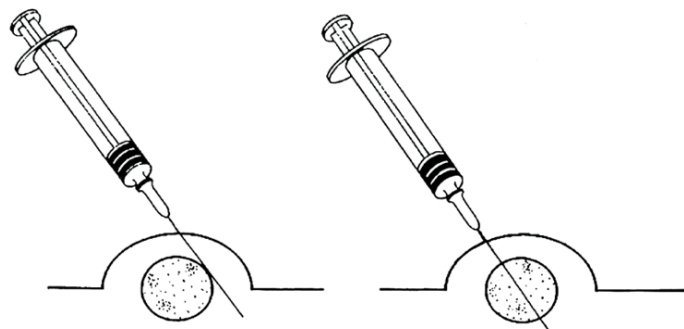


Figure 2: Cytoponction réalisée dans une zone non représentative [11].

Pour limiter cet écueil, il est conseillé de multiplier les prélèvements et les zones de cytoponction [11].

- Hémodilution : si l'aspiration est à l'origine de la rupture de capillaires sanguins (aiguille de trop grand calibre ($< 22G$) ou aspiration à pression négative trop forte voire prolongée), les cellules sanguines aspirées gênent voire empêchent la lecture. Dans ce cas, il faut changer d'aiguille et de seringue avant de réaliser d'autres prélèvements. Dès que du sang commence à être visible dans la garde de l'aiguille, l'aspiration doit être stoppée et le contenu étalé sur une lame. Enfin, dans les cas de lésions richement vascularisées, la réalisation de cytoponctions sans aspiration permet de diminuer la contamination sanguine [11][25].

1.1.6. Techniques d'étalement sur lame

Le but de la technique d'étalement est de transformer une masse multicellulaire en trois dimensions en une fine monocouche de cellules, sans toutefois entraîner une rupture de celles-ci [5][11][25].

Une fois le matériel récolté dans l'aiguille avec ou sans aspiration, celle-ci est désolidarisée de la seringue, qui est alors remplie de 4 à 6 mL d'air, avant d'être remontée avec l'aiguille. Ensuite, le biseau de l'aiguille est tourné vers la lame, et le piston de la seringue est enfoncé afin d'expulser l'air et le contenu de l'aiguille sur une lame de verre préalablement dégraissée [5][11]. Il est essentiel de retirer l'aiguille avant d'aspirer de l'air dans la seringue, sinon le spécimen sera aspiré dans la seringue et la quantité expulsée sera moindre [5].

Plusieurs techniques d'étalement sur lame existent. Seule la technique plus utilisée sera détaillée ici. Le matériel récolté dans l'aiguille est projeté sur la lame à environ 1 centimètre de l'extrémité dépolie (*Figure 3.A*). Une seconde lame de verre est placée au-dessus de la première, perpendiculaire et posée à plat sur celle-ci (*Figure 3.B*). Le prélèvement se retrouve alors aplati entre les deux lames, puis la lame supérieure est tirée le long de la surface de la lame inférieure, en éloignant le matériel de l'extrémité dépolie (*Figures 3.C et 3.D*) [5][6][11][25].

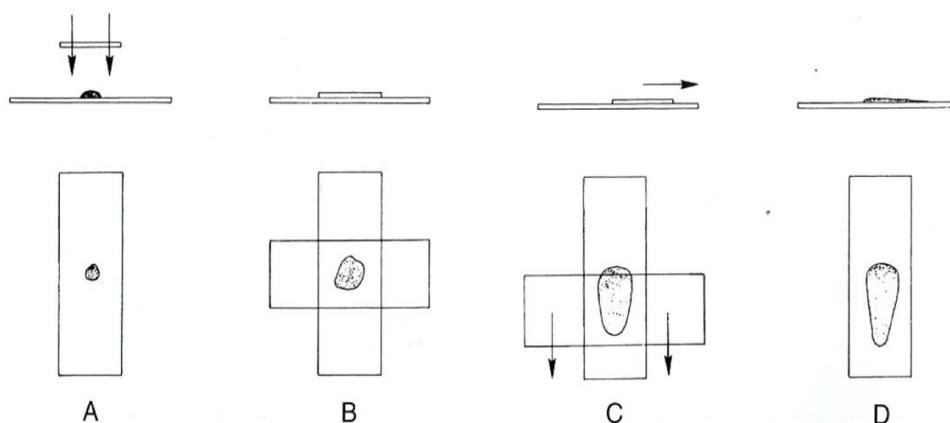


Figure 3: Schématisation de la technique d'étalement conventionnel sur lame d'un spécimen prélevé par cytoponction à l'aiguille fine [11].

La clé pour obtenir un spécimen fin et uniforme est de projeter une petite quantité de matériel sur la lame, et de maintenir une pression douce de même intensité tout au long de l'étalement du spécimen.

Si le prélèvement est épais ou granuleux, il est nécessaire de relâcher doucement la pression exercée par la lame supérieure en la décollant très légèrement, avant de la faire glisser sur la lame inférieure. Si une pression trop forte est exercée entre les deux lames, les cellules de l'épécimen se retrouvent souvent rompues. Il s'agit du principal inconvénient de cette méthode, entraînant de fortes ruptures cellulaires lorsqu'elle est réalisée par des personnes inexpérimentées. Les cellules lymphoïdes sont particulièrement fragiles et sont amenées à rompre même lors d'une pression modérée appliquée sur les deux lames [11].

Si une trop grosse goutte est appliquée sur une lame, il est possible d'utiliser la technique d'étalement du frottis sanguin (*Figure 4*).

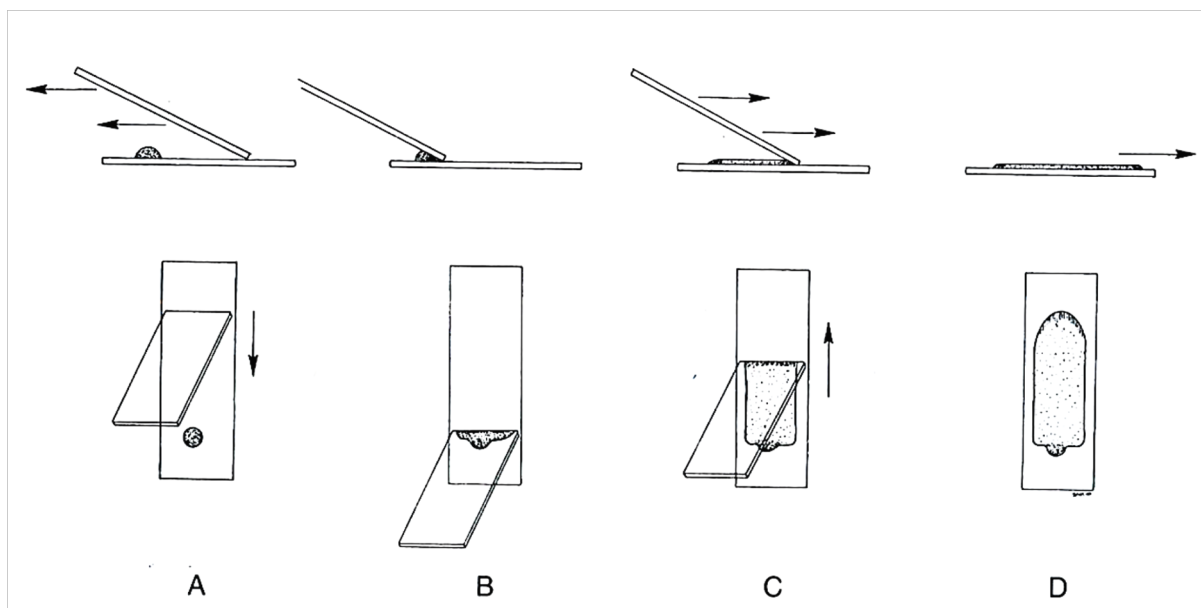


Figure 4: Schématisation de la technique d'étalement d'un frottis sanguin [11].

1.2. Technique de calque par impression

Les techniques de calque par impression sont utilisées principalement sur les lésions superficielles ulcéraives ou exsudatives, ou encore sur les tissus collectés lors de

chirurgies (biopsies ou exérèse de tissus) ou d'autopsies en vue d'une analyse histopathologique [11].

Cette méthode est idéale pour coupler analyses cytologique et histologique des masses, en permettant l'évaluation immédiate d'une biopsie. Les résultats de l'analyse cytologique peuvent alors être comparés aux résultats histopathologiques, l'analyse histologique demeurant le « gold standard » en matière de diagnostic de référence [5][25].

Lors de la réalisation de calques par impression sur des lésions ulcérées ou exsudatives, les cellules tumorales ne peuvent pas s'exfolier, et seules les cellules inflammatoires sont retrouvées sur la lame. Cette technique est donc plus utile pour identifier des agents infectieux bactériens ou fongiques que des processus néoplasiques [11].

Lors de la réalisation de calques sur des biopsies ou des pièces d'exérèse chirurgicales, ceux-ci doivent être recoupés afin de réaliser l'impression sur une surface « fraîche » et ceci avant fixation dans le formol. Il faut d'ailleurs s'assurer que les lames de cytologie confectionnées soient conservées à l'écart des pots de fixateur car la présence de formol -même dans des pots fermés-, à proximité des lames peut suffire à fixer les spécimens cytologiques les rendant impropres à l'immunomarquage. Trois à quatre silhouettes sont imprimées sur une même lame avec un gradient croissant de pression (*Figure 5*) [5][11][18][25].

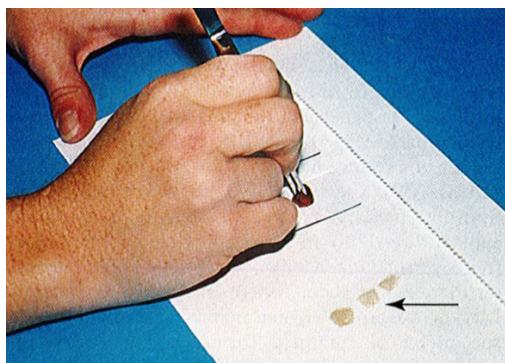


Figure 5: Photographie montrant la technique de calque par impression [25].

Comme pour les cytoponctions à l'aiguille fine, un nombre élevé de spécimens augmente les chances de représentativité des prélèvements, et les calques par impression doivent être réalisés sur chaque zone du tissu d'intérêt semblant différente d'une autre

[11][25]. Néanmoins, si les spécimens de biopsie sont très petits, il faut veiller à ne pas détruire le tissu d'intérêt pour l'évaluation histologique. L'inconvénient majeur de la technique de calque par impression est que seules les cellules à la surface de la lésion peuvent être collectées, ce qui peut rendre l'échantillon non représentatif. De plus, une contamination bactérienne est plus probable avec cette méthode [6].

Le Tableau 1 résume les indications des techniques d'aspiration à l'aiguille fine et de calque par impression. Seules ces techniques sont utilisées pour l'immunocytochimie.

Tableau 1 : Indications et caractéristiques des méthodes de prélèvement en cytologie. D'après [11].

Méthode de prélèvement	Indications	Commentaires
Aspiration à l'aiguille fine	<ul style="list-style-type: none"> - Masses (de surface ou internes) - Nœuds lymphatiques - Organes internes - Collections liquidiennes 	<ul style="list-style-type: none"> - Meilleure méthode pour prélever des masses cutanées ou sous-cutanées en limitant toute contamination de surface - Meilleure méthode pour prélever de façon peu invasive des masses ou organes internes
Calque par impression	<ul style="list-style-type: none"> - Lésions cutanées exsudatives - Spécimens réalisés à partir de tissus biopsiés pour analyse histologique (ex : nœuds lymphatiques, foie, rate, ...) 	<ul style="list-style-type: none"> - Très utile pour identifier des agents infectieux - Prélèvement essentiellement des cellules superficielles et des contaminations de surface (problématique pour tumeurs ulcéraires) - Il est impératif d'éponger l'excès de sang du spécimen - Les calques doivent être effectués avant de placer le spécimen dans du formol

2. ROLE DE L'IMMUNOCYTOCHIMIE DANS LE DIAGNOSTIC DE TUMEURS CHEZ LES CARNIVORES DOMESTIQUES

Les techniques de cytologie conventionnelle sont des méthodes non invasives largement utilisées pour le diagnostic d'affections bénignes ou malignes, ou encore pour l'identification d'agents infectieux. Toutefois, elles ont leurs limites ; le diagnostic de certitude reposant sur l'analyse histopathologique. Néanmoins, le diagnostic cytologique avec l'aide de l'immunocytochimie apporte fiabilité diagnostique et éléments pronostiques [10][23].

En médecine humaine, cette technique complémentaire est désormais largement réalisée dans les laboratoires européens d'anatomie et cytologie pathologiques, en utilisant des spécimens cytologiques comme les étalements sur lames, cytopsins, cytologies en milieu liquide ou cytoblocs d'inclusion en paraffine [29]. Selon une enquête réalisée en 2019 à laquelle 245 laboratoires ont répondu, le nombre moyen d'analyses immunocytochimiques effectuées par an en Europe est de 1477 [29]. La majorité des laboratoires effectuent la technique d'immunocytochimie sur des plateformes automatisées en appliquant des protocoles identiques à ceux utilisés en immunohistochimie sur les inclus en paraffine. Néanmoins, cette même enquête révèle l'étendue de la variabilité des différentes étapes de la technique immunocytochimique, aussi bien au niveau des étapes pré-analytiques comme les types de préparations cytologiques, que des étapes de fixation et d'immunomarquage. De plus, à ce jour, il n'y a pas de réelles lignes directrices concernant l'ajustement des protocoles immunohistochimiques aux spécimens cytologiques, et seulement 29% des laboratoires ont optimisé et validé leurs protocoles d'immunocytochimie [29].

En médecine vétérinaire, l'immunocytochimie est développée essentiellement dans certains grands laboratoires de biologie médicale vétérinaires universitaires, majoritairement en tant qu'outil diagnostique [23], pour reconnaître et classer les néoplasies en identifiant spécifiquement les types cellulaires. En effet, elle permet de différencier les tumeurs de nature lymphoïdes des non lymphoïdes (les anticorps dirigés contre des déterminants antigéniques non lymphoïdes les plus couramment utilisés sont des marqueurs histiocytaires, épithéliaux et mésenchymateux), et sert aussi fortement à l'immunophénotypage du lymphome et de la leucémie, grâce à un panel d'anticorps

permettant d'identifier les lymphocytes T , B et leurs sous-types [1][23][25][27]. Certains anticorps encore peu rapportés dans la littérature de l'immunocytochimie vétérinaire, sont utilisés. Il s'agit de marqueurs de cellules endothéliales, thyrocytes, mégacaryocytes pour les principaux [23].

2.1. Principe général de l'immunocytochimie

Le principe de l'immunocytochimie, comme celui de l'immunohistochimie, repose sur la liaison et la spécificité étroite entre un anticorps et un antigène. Le tissu ou les cellules sont incubés avec des anticorps développés pour reconnaître un antigène particulier. Alors que l'immunocytochimie est réalisée sur des spécimens cytologiques, l'immunohistochimie est généralement pratiquée sur des coupes fixées au formol incluses en paraffine, ou encore des coupes de tissus congelés [23].

2.1.1. La préparation des spécimens en amont

En amont, il est cependant nécessaire de fixer les cellules à analyser afin de préserver les structures cellulaires et faciliter le marquage. Les conditions de stockage des lames jusqu'à l'initialisation de la procédure d'immunocytochimie et la mise en place de spécimens contrôles sont également des points importants à prendre en compte.

La fixation :

Si les prélèvements cytologiques sont traités et marqués dans les 24 heures, le processus de fixation cellulaire et de récupération d'antigène n'est pas nécessaire en cytologie, c'est pourquoi la technique du démasquage antigénique n'est pas systématiquement utilisée pour l'immunocytochimie réalisée sur les étalements conventionnels sur lames lorsque les antigènes membranaires sont facilement accessibles. Au contraire, le démasquage antigénique est indispensable pour les spécimens plus anciens, mais aussi lors d'immunocytochimie portant sur des antigènes du noyau, ou encore sur les lames issues de cytoblocs [11].

Pour les antigènes nucléaires (tels que ER, PGR, AR, CDX2, TTF-1, P63, WT-1, PAX2, PAX8 et MIB-1), de bons résultats ont été observés en fixant les spécimens séchés à l'air libre dans du formol tamponné à 4%, tamponné à 10%, ou encore dans du formol suivi par une récupération d'antigène dans une solution de méthanol-acétone ou encore au micro-ondes. L'utilisation de formol est donc souvent indispensable à la fixation des antigènes nucléaires. De plus, ce type de fixation offre des avantages par rapport à l'acétone, comme un maintien de l'antigénicité, une préservation de la morphologie cellulaire et une plus forte adhérence des cellules à la lame. Néanmoins, la nécessité d'ajouter une étape de démasquage antigénique à la suite de la fixation au formol reste un inconvénient majeur, d'autant plus que certains antigènes restent inactifs, même après ce processus de récupération d'antigène [10][11][23].

Pour les antigènes membranaires et cytoplasmiques, le type de fixation n'est pas aussi crucial que pour les antigènes nucléaires, car une variété de fixateurs, y compris le formol suivi de l'éthanol, un mélange méthanol-éthanol absolu, ou une fixation dans de l'acétone refroidie à 4°C donnent de bons résultats. Ce dernier est donc utilisé par la plupart des auteurs comme fixateur de routine pour l'immunocytochimie [1][23][25][28][30].

Pour que la technique d'immunocytochimie réalisée ait une performance optimale, le choix du fixateur utilisé doit être déterminé par l'antigène particulier étudié. Par exemple, pour les marqueurs hématopoïétiques, la fixation dans de l'acétone à température ambiante semble donner les meilleurs résultats, alors que pour les marqueurs non hématopoïétiques, une fixation dans un mélange méthanol-alcool absolu est la plus efficace [1][30].

Ainsi, selon les études réalisées, les méthodes de fixation semblent très variées. Certaines études préconisent de sécher les lames à l'air libre lors de suspicion de lymphome, et de fixer immédiatement les lames dans de l'éthanol à 95% sans séchage dans les autres cas. D'autres auteurs utilisent une solution saline particulière comme « fixateur universel ». Enfin, une technique de fixation immédiate des lames a été mise en place par un laboratoire, en fixant les spécimens utilisés pour les marqueurs lymphoïdes et de mélanomes 5 à 10 minutes à température ambiante dans de l'acétone,

les lames utilisées pour les marqueurs épithéliaux 5 minutes à température ambiante dans 95% d'éthanol ou dans un mélange de méthanol et d'éthanol à 100%, et les spécimens utilisés pour les antigènes nucléaires dans 3,7% de formol tamponné pendant 15 minutes [24][25].

Malheureusement, le large éventail de procédures de fixation rend la normalisation des procédures de récupération d'antigène entre les laboratoires très difficile. Chaque laboratoire doit optimiser la technique pour chaque antigène [3]. Les types de fixation et les techniques de démasquage antigénique doivent donc être systématiquement adaptés aux spécimens cytologiques prélevés et aux antigènes à tester, et doivent être vérifiés au préalable sur des spécimens témoins dits contrôles, afin d'assurer une préservation morphologique optimale, et une perte cellulaire minimale. Si le spécimen du patient a été fixé au formol avec récupération antigénique, il doit en être de même pour les contrôles [10][11][23].

Le stockage :

Lorsque les spécimens ne peuvent pas être fixés immédiatement, le stockage des lames séchées à l'air libre est possible pendant 2 semaines si celles-ci sont maintenues entre 2°C et 8°C. Les spécimens sont placés dans une boîte de lames en plastique, puis dans un sac en plastique à fermeture à glissière contenant un dessiccant. La congélation à -4°C semble prolonger la viabilité des spécimens, et si un stockage plus long est nécessaire, les lames doivent être conservées à -70 ° C. A cette température, les cellules peuvent conserver leur antigénicité pendant plus d'un an. En cas de congélation des spécimens, il est important de les laisser se réchauffer à température ambiante avant utilisation [10][23][25][30].

En revanche, la viabilité cellulaire des frottis séchés à l'air libre et laissés à température ambiante (soit environ 20°C) sans être fixés est de seulement trois à quatre jours. Après ce délai, les antigènes de surface ne peuvent plus être détectés.

En plus de ces faux négatifs engendrés par la perte des antigènes de surface, des faux positifs peuvent aussi résulter du séchage à l'air libre sans fixation, notamment avec des anticorps dirigés contre certaines protéines du cytosquelette. La fixation s'avère donc très utile pour permettre une conservation des épitopes antigéniques. Néanmoins, il

semblerait que pour les spécimens réfrigérés fixés à l'acétone, l'antigénicité puisse être perdue au bout de 3 à 4 mois [10][11][23][33].

Les contrôles :

La mise en place de lames témoins dits « contrôles » doit faire partie intégrante des procédures d'immunocytochimie. Le contrôle négatif teste la réactivité croisée non spécifique de l'anticorps testé. Il doit démontrer que l'anticorps secondaire se lie spécifiquement à l'anticorps primaire sans se lier de façon non spécifique à d'autres structures [11][23]. Un contrôle positif approprié est constitué de cellules qui expriment l'antigène d'intérêt, acquises à partir du tissu d'un individu de la même espèce que le patient. Il est ainsi utile de disposer d'une banque de témoins positifs, mais cela reste problématique dans les laboratoires où l'immunocytochimie est peu pratiquée [11][23].

Pour tous les contrôles, la préparation de la lame doit être la même que pour spécimen testé, ce qui n'est pas toujours facile en pratique. L'utilisation de spécimens de contrôles inappropriés est l'une des erreurs les plus courantes commises en immunocytochimie, comme lors de l'utilisation de coupes fixées au formol et incluses en paraffine comme contrôles positifs et négatifs pour de l'immunocytochimie réalisée sur des échantillons cytologiques fixés à l'acétone [23].

2.1.2. Quelques particularités dans les étapes de la procédure immunocytochimique

Une réaction immunohistochimique ou immunocytochimique peut être scindée en trois étapes : 1/ le prétraitement, 2/ l'incubation avec les anticorps primaires, secondaires voire tertiaires, 3/ la visualisation de la réaction immunologique [24][25]. Nous ne développerons pas ici le principe de la technique immunocytochimique mais mettrons en avant quelques particularités des étapes 2 et 3 pour celle-ci en comparaison avec la technique immunohistochimique :

1- Le Prétraitement (blocage des réactions endogènes et réactivation de l'antigène) :

- En présence d'étalements riches en cellules sanguines, un blocage de la peroxydase endogène, riche dans les granulocytes, est fortement indiqué.

- La réactivation de l'antigène : cette étape est parfois nécessaire quand les étalements cellulaires sont fixés avec des alcools ou du formol. La technique de démasquage antigénique par la chaleur, encore appelée HIER (Heat Induced Epitope Retrieval) est plus utilisée en immunocytochimie que la récupération enzymatique (ou PIER, pour Protease Induced Epitope Retrieval). Cette méthode, qui utilise le plus souvent un tampon citrate à pH 6,0, est nécessaire pour la plupart des antigènes nucléaires sur des lames fixées à l'éthanol, mais aussi pour certains antigènes cytoplasmiques, et permet d'améliorer l'efficacité de la réaction immunocytochimique. En effet, selon une étude réalisée par *Denda et al.* en 2012 [13], pour les frottis fixés à l'éthanol, la récupération d'antigène s'est avérée indispensable pour les anticorps dirigés contre des antigènes nucléaires, tandis que la plupart des anticorps dirigés contre des antigènes cytoplasmiques ou membranaires pouvaient être révélés avec succès sans démasquage, ou avec une technique de HIER assez légère utilisant un tampon citrate à pH. 6,0. Les spécimens fixés au formol, quant-à-eux, devaient tous subir l'étape de récupération d'antigène. De plus, dans cette étude, la technique de PIER a fréquemment exercé des effets délétères sur les frottis fixés à l'éthanol [13]. Certains laboratoires effectuent le démasquage antigénique par la chaleur quel que soit le type de fixation utilisée [3][10].

De bons résultats sont observés en utilisant la technique HIER, où les prélèvements étalés sur lames sont chauffés dans une solution saline. Néanmoins, les lames doivent auparavant être « chargées », c'est-à-dire recouvertes de sérum ou d'une autre protéine favorisant l'adhésion des cellules à la lame, pour éviter un détachement de celles-ci pendant le processus de chauffage. Il est également conseillé d'utiliser des lames adhésives afin d'éviter au maximum la perte de matériel cytologique [24][25][33].

Pour la plupart des antigènes, le tampon citrate à pH 6,0 associé au chauffage des spécimens permet une bonne efficacité de la récupération d'antigène. Le principe de la récupération d'antigène est de solubiliser les membranes cellulaires des spécimens cytologiques fixés au formol, permettant ainsi aux anticorps d'accéder aux antigènes intracytoplasmiques [33].

3- La visualisation :

Un frottis très hémorragique entraîne un bruit de fond conséquent, notamment lors de l'utilisation d'une réaction avec la peroxydase, rendant l'interprétation impossible. Il est alors possible d'utiliser la phosphatase alcaline dans l'étape de visualisation [10].

De plus et comme expliqué précédemment, un certain nombre de facteurs peuvent conduire à l'apparition de faux négatifs, mais aussi de faux positifs. Les conditions de préparation des lames en amont ainsi que la procédure d'immunomarquage sont donc très importantes pour éviter au maximum l'obtention de résultats ininterprétables.

Enfin, selon une enquête réalisée par la Fédération Européenne des Sociétés de Cytologie, la variabilité des résultats semble largement diminuée et la qualité de l'immunocytochimie significativement améliorée avec l'utilisation d'automates, de lames témoins, et de dilutions d'anticorps [10][11].

2.2 Intérêt de l'immunocytochimie en diagnostic chez le chien et le chat

L'immunohistochimie est largement plus utilisée que l'immunocytochimie en tant qu'outil diagnostique en médecine vétérinaire, car même si la technique d'immunocytochimie est réalisée sur la base de la procédure immunohistochimique, des adaptations doivent être faites par rapport à l'histologie, et les informations disponibles pour guider son utilisation et son interprétation sont relativement faibles. Pourtant, celle-ci pourrait devenir un outil précieux, non seulement en cytologie diagnostique, mais aussi dans la recherche clinique et clinico-pathologique en médecine vétérinaire [23][28].

2.2.1. Avantages et inconvénients de l'immunocytochimie comparativement à la procédure immunohistochimique

Un examen cytologique a de nombreux avantages dont son coût et surtout sa rapidité d'exécution comparativement à une analyse histopathologique. En effet, la technique de prélèvement par aspiration à l'aiguille fine étant moins invasive que la biopsie -qui est la technique de prélèvement de choix en histologie-, les coûts et le risque

anesthésiques sont réduits, et il est facilement possible de réaliser de nouveaux prélèvements si des résultats non diagnostiques sont obtenus [8][11][23].

De plus, le temps de traitement des spécimens dans la procédure d'immunocytochimie étant plus court qu'en histopathologie, il est possible d'obtenir des résultats le jour même, ce qui peut s'avérer très utile pour obtenir un diagnostic pré-opératoire rapide afin d'orienter les procédures chirurgicales et les protocoles de chimiothérapie. Cette rapidité d'obtention des résultats est également mise à profit en médecine humaine pour détecter des nœuds lymphatiques métastatiques en per-opératoire.

En outre, la technique d'immunocytochimie permet l'utilisation d'anticorps qui sont inactivés dans les tissus fixés au formol et inclus en paraffine, comme les sous-ensembles de lymphocytes T [23].

Bien que simple à mettre en place, la cytologie seule ne permet donc pas d'obtenir un diagnostic de certitude, notamment lors de suspicion de processus tumoral. Il est donc essentiel de l'associer à d'autres techniques comme l'histologie, l'immunohistochimie, mais aussi l'immunocytochimie. De plus, le diagnostic spécifique de néoplasie doit d'abord être établi par cytologie ou confirmé si possible par histologie. Le diagnostic cytologique est ensuite complété par immunocytochimie. Les lames utilisées pour l'immunocytochimie doivent idéalement être obtenues à partir du même spécimen que celui utilisé pour la cytologie classique.

L'immunocytochimie représente donc un examen complémentaire qui augmente la spécificité du diagnostic, mais elle permet aussi d'évaluer la morphologie des cellules, et de visualiser une population cellulaire d'intérêt et son immunoréactivité, ce qui peut s'avérer utile pour permettre l'identification de cellules en faible quantité dans un tissu (par exemple, l'identification de cellules épithéliales dans un thymome, ou encore une micrométastase dans un nœud lymphatique), et peut s'avérer précieuse dans l'immunophénotypage de néoplasies, afin d'orienter le pronostique ou la décision thérapeutique, voire représenter l'élément déclencheur d'une demande de biopsie ou d'exérèse chirurgicale de tissu [10][11][20][23][28].

Néanmoins, les principales limites de la procédure immunocytochimique reposent sur la difficulté à obtenir un nombre suffisant de spécimens d'assez bonne

qualité pour poser un diagnostic. En effet, contrairement à l'immunohistochimie où des centaines de spécimens quasiment identiques peuvent être obtenus à partir d'un seul prélèvement inclus en paraffine, pour l'immunocytochimie, chaque spécimen résulte d'une unique aspiration à l'aiguille fine, ce qui peut entraîner de fortes variations de qualité d'un frottis à l'autre. C'est pourquoi les problèmes de bruit de fond trop important résultant d'un frottis trop épais, de cellules rompues, ou encore de débris cellulaires, sont courants en immunocytochimie. Pour limiter cela, l'utilisation de cytopins ou de cytoblocs peut aider à réduire le bruit de fond et à réaliser des spécimens de meilleure qualité, mais ces techniques ne conviennent pas à tous les types d'échantillons, notamment les tissus solides peu exfoliants, comme étudiés dans nos expériences [8][11][20][23].

De plus, les protocoles de marquage en immunocytochimie varient des protocoles immunohistochimiques, c'est pourquoi les automates utilisés en histologie ne sont encore que peu employés pour la cytologie, et les étapes de la procédure immunocytochimique sont donc la plupart du temps réalisées manuellement. Une optimisation des méthodes automatisées permettrait un gain de temps précieux [23].

Pour des tumeurs mal différenciées, la cytologie peut s'avérer insuffisante pour identifier le tissu d'origine. Par exemple, bien que pour de nombreux lymphomes, le diagnostic cytologique soit suffisant, pour certains autres comme le lymphome à petites cellules, le sous-typage définitif nécessite une évaluation de la clonalité ou une connaissance de l'architecture tumorale. L'examen histologique s'avère alors incontournable [11][20][23].

Même si l'immunocytochimie augmente la spécificité et la sensibilité de l'analyse cytomorphologique, des pièges sont toutefois présents dans l'interprétation des spécimens obtenus par immunocytochimie. Tout d'abord, et comme évoqué dans la sous partie I.2.1.1., un immunomarquage faussement positif peut résulter d'un matériel mal fixé, d'un mauvais type de fixateur, d'un blocage insuffisant de l'activité de la peroxydase endogène, ou encore et d'un bruit de fond trop élevé. Ensuite, un mauvais type de fixateur peut également entraîner l'apparition de faux négatifs, par exemple en utilisant de l'alcool pour fixer des antigènes nucléaires. Les autres causes principales d'obtention de faux négatifs sont une concentration trop faible en anticorps spécifique, et une fragilité cellulaire accrue, comme chez de nombreux lymphomes de haut grade et chez certains

carcinomes peu différenciés, où le cytoplasme est peu adhérent et donc peu conservé lors de la procédure immunocytochimique [20][30].

En outre, la pauvreté des informations et des directives publiées concernant les protocoles immunocytochimiques est un frein à l'avancée de la méthode, d'autant plus qu'il semble difficile d'obtenir des lames de contrôle positifs et négatifs ayant reçu les mêmes traitements que les spécimens étudiés. Cela oblige souvent chaque laboratoire à établir son propre protocole en amont, et à faire ses propres essais de contrôles pour déterminer ce qui est interprété comme un résultat positif ou au contraire négatif, ce qui nécessite un temps de travail supplémentaire considérable [23][24].

Enfin, d'après une étude de *Ku et al.* publiée en 2016 cherchant à étudier la concordance entre cytologie et histologie dans le diagnostic des néoplasies sur des nœuds lymphatiques de chiens et de chats, le diagnostic cytologique s'accorderait avec l'histologie dans seulement 65% et 80% des cas chez le chat et le chien respectivement. Cette étude témoigne donc de la difficulté à émettre un diagnostic fiable lorsque la cytologie est employée seule. L'analyse cytologique isolée sous-estime la prévalence des lymphomes chez le chat [17].

2.2.2. Anticorps utilisés en immunocytochimie chez le chien et le chat

De nombreux anticorps ont été validés pour être utilisés en immunocytochimie chez le chien et le chat [11][23][27].

Pour citer un premier exemple, la cytokératine et la vimentine sont des filaments intermédiaires cytoplasmiques utilisés pour identifier deux types tissulaires distincts. Les cellules exprimant la cytokératine et n'exprimant pas la vimentine sont considérées comme d'origine épithéliale. La cytokératine est donc assez spécifique dans l'identification de cellules épithéliales. Les anticorps dirigés contre la vimentine sont utilisés pour identifier les tumeurs provenant du tissu conjonctif. Ainsi une tumeur exprimant la vimentine et non la cytokératine est considérée comme ayant une origine mésenchymateuse [11][24][28].

Cependant, un petit groupe de néoplasies et de proliférations bénignes exprime à la fois la cytokératine et la vimentine. Nous pouvons citer par exemple le sarcome à cellules synoviales, le mésothéliome bénin, le carcinome papillaire rénal, le mélanome.

L'expression de la cytokératine et de la vimentine doit être testée conjointement. C'est pourquoi il est préférable d'utiliser un panel d'anticorps, dont des anticorps dirigés à la fois contre la cytokératine et la vimentine, en plus d'autres anticorps plus spécifiques. [11][28].

Un second exemple est donné avec les antigènes de la lignée lymphoïde, récepteurs des cellules B ou T. Leur mise en évidence peut être utile, à la fois pour connaître la nature de la prolifération lymphoïde, différencier les populations lymphoïdes de populations myéloïdes, mais aussi parfois pour aider à établir la probabilité de clonalité. Pour la plupart des espèces animales, les sous-ensembles de lymphocytes peuvent être plus facilement évalués sur des échantillons cytologiques que des préparations histologiques, car les antigènes de cette famille peuvent être altérés sur des tissus inclus en paraffine. La détection de métastases dans les nœuds lymphatiques peut être facilitée par l'immunocytochimie. Ici aussi, l'utilisation conjointe de plusieurs anticorps peut être utile pour déterminer la lignée cellulaire lors de néoplasies à cellules rondes mal différenciées [23][27].

Une enquête sur l'utilisation de l'immunocytochimie réalisée par *Priest et al.* en 2016 a révélé que les anticorps les plus couramment utilisés en médecine vétérinaire étaient ceux dirigés contre les marqueurs lymphoïdes, notamment le CD3 pour l'identification des lymphocytes T, mais plus rarement le CD4, CD8, voire des anticorps dirigés contre des chaînes spécifiques du récepteur aux cellules T (TCR) comme les chaînes $\alpha\beta$ ou les chaînes $\gamma\delta$, pour identifier des sous-ensembles de cellules T. Pour l'identification de lymphocytes B, le marqueur le plus utilisé est le CD79 et/ou le CD20, et que d'autres marqueurs tels que PAX5, BLA36 et MUM1/IRF4 sont plus rarement utilisés. Pour les marqueurs non lymphoïdes, les plus couramment utilisés sont des marqueurs histiocytaires comme la Cytokératine, et la Vimentine [23].

Le tableau ci-dessous reprend les anticorps les plus utilisés à l'heure actuelle en immunocytochimie chez les carnivores domestiques [11][13][23].

Tableau 2: Anticorps actuellement utilisés en Immunocytochimie chez le chien et le chat, d'après Cowell et al. 2020 [11].

Antigène	Localisation antigénique
CD3	Lymphocytes T
CD4	Lymphocytes T-auxiliaires
CD8	Lymphocytes T-auxiliaires, Lymphocytes T cytotoxiques
CD18	Macrophages, granulocytes
CD20	Lymphocytes B, plasmocytes
CD31	Cellules endothéliales, plaquettes, monocytes
CD34	Cellules souches
CD41	Plaquettes, mégacaryocytes
CD79a	Lymphocytes B
CD117 (cKit)	Mastocytes, cellules souches
MUM1	Plasmocytes, cellules B matures
Cytokératine	Cellules épithéliales
Vimentine	Cellules mésenchymateuses
Melan-A	Mélanocytes

L'étude expérimentale réalisée dans ce travail utilise des anticorps dirigés contre le CD3, le CD20, la Vimentine, et la Cytokératine. L'objectif étant de différencier trois origines cellulaires : lymphoïde (CD3 et CD20), épithéliale (Cytokératine), et mésenchymateuse (Vimentine). Ces quatre anticorps ont été choisis car ils avaient déjà tous été utilisés en immunocytochimie chez le chien et le chat par l'équipe de la Professeure Rose Raskin de l'Université Vétérinaire de Purdue (Etats Unis) [26][27].

Les classes de différenciation (CD) (en anglais « clusters of differentiation ») sont des glycoprotéines membranaires classées selon une nomenclature internationale utilisée pour l'identification et l'immunophénotypage des cellules du système immunitaire.

2.1.2.1. Le CD3

Le CD3 est un complexe protéique composé de trois chaînes polypeptidiques ou dimères : CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$, et CD3 $\zeta\zeta$. Il est exprimé dans toutes les cellules T. Ce complexe CD3 s'associe avec le récepteur des cellules T, le TCR, qui est un hétérodimère $\alpha\beta$ glycosylé exprimé à la surface des cellules T. Les sous-unités TCR α et TCR β se lient par des liaisons non covalentes aux sous-unités CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , et CD3 ζ , pour former le « complexe TCR », et générer, une fois l'antigène reconnu par le TCR, la transduction du signal vers l'intérieur des lymphocytes T. En effet, celui-ci est présent dans les organes lymphoïdes primaires (thymus, moelle osseuse) et secondaires (nœuds lymphatique, rate), le tissu lymphoïde associé aux muqueuses, et le sang [2].

Les anticorps anti-CD3 utilisés en immunohistochimie et en immunocytochimie permettent de reconnaître les cellules T dans tous ces organes, et comme le CD3 est présent à tous les stades du développement des lymphocytes T, même dans les thymocytes précoces, il s'agit d'un marqueur de lymphocytes T optimal [8].

Néanmoins, l'expression du CD3 est uniquement cytoplasmique dans les thymocytes précoces, alors qu'elle est membranaire et cytoplasmique dans les cellules matures [21][32].

L'anticorps anti-CD3 utilisé dans nos expérimentations est un anticorps polyclonal de lapin réagissant contre la protéine CD3 humaine. Il marque les membranes et le cytoplasme des lymphocytes T. Il fait partie des anticorps référencés en médecine vétérinaire pour fonctionner chez le chien en immunocytochimie [25].

2.1.2.2. Le CD20

Le CD20 est une protéine de surface des lymphocytes B de 35 kDa jouant un rôle dans le développement et la différenciation des lymphocytes B et des plasmocytes. Il est exprimé à la fois sur les cellules pré-B, les lymphocytes B immatures, les lymphocytes matures, et aussi sur les plasmocytes différenciés terminaux, qu'ils soient normaux ou

malins. Le CD20 est donc l'un des marqueurs les plus importants pour les cellules B. Il est retrouvé dans la plupart des néoplasies touchant les cellules B, mais a également déjà été détecté sur des cellules T normales et néoplasiques. Il a par exemple été rapporté de manière exceptionnelle dans des cas des lymphomes T comme le lymphome cutané [9][15][16].

L'anticorps anti-CD20 utilisé dans nos expérimentations est un anticorps polyclonal de lapin réagissant contre la chaîne C-terminale d'une protéine CD20 humaine. Il marque les membranes et le cytoplasme des lymphocytes B. Il a déjà été utilisé dans plusieurs travaux en médecine vétérinaire et semble fonctionner chez le chien et le chat [25].

2.1.2.3. La Cytokératine

Les cytokératines représentent une sous-famille de protéines appartenant à la famille des filaments intermédiaires. Elles sont numérotées de 1 à 20, sont très différentes les unes des autres, et leur poids moléculaire varie entre 40 et 68 kDa. Chaque cytokératine est généralement spécifique d'un type d'épithélium donné, mais également d'un degré de maturation ou de différenciation à l'intérieur de l'épithélium. Les anticorps anti-cytokératine sont utilisés pour diagnostiquer des tumeurs d'origine épithéliale par immunohistochimie sur des coupes de tissus. [7][14][19][34].

Dans nos expériences, nous utilisons, une association de deux anticorps monoclonaux anti-cytokératine 1 et 3 (AE1/AE3) obtenus en immunisant des souris avec des kératines de callosités humaines. La combinaison d'anticorps AE1/AE3 est déjà connue pour identifier la majorité des cytokératines humaines, et pour marquer épithéliums simples et stratifiés. Elle peut donc être utilisée dans l'aide à la classification des tumeurs d'origine épithéliale ainsi que des carcinomes indifférenciés. Cet anticorps fait partie de la liste de ceux utilisés en immunocytochimie vétérinaire et semble fonctionner pour le chien et le chat [19][25].

2.1.2.4. La Vimentine

La vimentine est une protéine de 57 à 60 KDa appartenant à la classe III de la famille des filaments intermédiaires cytoplasmiques. C'est l'un des principaux composants de la structure du cytosquelette des cellules. Elle joue un rôle essentiel dans l'intégrité cellulaire et la stabilité du cytosquelette. Elle est exprimée dans la plupart des cellules d'origine mésenchymateuse comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, et les cellules musculaires lisses [3][22].

Lors de son utilisation en immunohistochimie, on observe un marquage positif pour la vimentine dans la plupart des cellules de type sarcomes (fibrosarcomes, liposarcomes, histiocytomes fibreux malins, angiosarcomes, chondrosarcomes), mais aussi dans certains cas de mélanomes, et de lymphomes. Parfois, il s'avère que la vimentine est également exprimée par des tumeurs de nature épithéliale ou neurale [21].

En raison de sa large gamme de réactivité, la vimentine est souvent utilisée comme contrôle de la réaction immunohistochimique, car la non-réactivité de l'anti-vimentine est souvent considérée comme plus utile que sa positivité.

L'anticorps anti-vimentine seul a donc souvent un faible intérêt diagnostique. Cependant, lorsqu'il est utilisé dans des panels avec d'autres anticorps, il est utile pour la sous-classification d'une tumeur donnée. L'utilisation de l'anti-vimentine, en association avec l'anti-kératine, est utile pour distinguer les mélanomes des carcinomes indifférenciés et des lymphomes à grandes cellules [3].

L'anticorps anti-vimentine utilisé dans nos expérimentations est issu de vimentine de cristallin de porc purifiée. Cet anticorps fait partie des anticorps référencés pour fonctionner en immunocytochimie chez le chien et le chat [25].

PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE

1. OBJECTIFS

L'objectif de cette étude est la mise au point technique de protocoles d'immunocytochimie pour la mise en évidence des tissus épithéliaux, mésenchymateux et lymphoïdes, et ceci afin de les introduire en routine au Laboratoire Central de Biologie Médicale (LCBM) de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT).

Comme déjà évoqué, nous nous sommes appuyés sur les travaux en immunocytochimie réalisés chez le chien et le chat par l'équipe de Rose Raskin [26][27].

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Spécimens cytologiques

Des lames de cytoponctions à l'aiguille fine (CPAF) et/ou des calques par impression provenant de trois organes (nœuds lymphatiques (NL), rate et foie), et issus de cadavres de chiens et de chats présentés dans le cadre de l'enseignement des cliniques d'autopsies de l'ENVT ont été réalisés. Les animaux avaient été euthanasiés au sein des cliniques de l'ENVT ou décédés par mort naturelle dans un délai de 48h maximum précédant leur autopsie.

Les lames ont été identifiées par : N° D'ENREGISTREMENT DE L'ANIMAL A L'ENVT – ORGANE.

2.2. Procédure expérimentale

Cette étude comprend deux parties distinctes : une partie concernant les CPAF/calques réalisés en salle d'autopsie, et une deuxième partie portant sur la réalisation des techniques d'immunocytochimie et l'analyse des lames.

2.3. Réalisation et stockage des lames

Sur une dizaine de cadavres, 6 CPAF de foies et autant de rates et 6 calques de nœuds lymphatiques ont été réalisés. Ensuite, les lames ont été stockées au Laboratoire Central de Biologie Moléculaire de l'ENVT, une était colorée au May-Gründwald Giemsa, cinq étaient archivées dans une boîte de stockage de lames (*Annexe 1*).

2.4. Anticorps

2.4.1. Anticorps primaires

La liste des anticorps primaires utilisés dans l'étude est présentée dans le Tableau 3 ci-dessous :

Tableau 3: Particularités des anticorps primaires.

Antigène	Anticorps primaire (Référence commerciale)	Espèce	Marquage
CD3	Polyclonal (A0452, Agilent, France)	Lapin	Membranaire Cytoplasmique
CD20	Polyclonal (F/RB-9013-P0, MM France)	Lapin	Membranaire Cytoplasmique
Cytokératine	Monoclonal AE1/AE3 (M351501-2, Agilent, France)	Souris	Cytoplasmique
Vimentine	Monoclonal V0 (M07529-2, Agilent, France)	Souris	Cytoplasmique

2.4.2. Anticorps secondaire

L'anticorps secondaire utilisé pour nos expérimentations était un polymère marqué à la peroxydase et conjugué à des immunoglobulines de chèvre anti-souris et de chèvre anti-lapin (*EnVision + Dual Link System – HRP DAKO*, Agilent, France).

2.5. Technique Immunocytochimique

Les principales étapes du protocole d'immunocytochimie utilisé dans cette étude sont regroupées dans le Tableau 4.

Tableau 4: Les différentes étapes de la technique d'immunocytochimie avec les références des principaux réactifs.

Étapes		Réactif utilisé (volume)				Durée
Rinçage		Tampon de rinçage (Wash Buffer 20X, Agilent Référence : K8007)				Trempe rapide
Étape 1	Blocage de l'activité de la peroxydase endogène	Dual Endogenous Enzyme Block, Agilent (250 µL) Référence : S2003				15 minutes (Essais préalables en Annexe 2)
Rinçage		Eau distillée				Trempe rapide
		Wash Buffer 20X, Agilent Référence : K8007				2 trempages rapides successifs
Étape 2	Blocage des protéines endogènes	Goat Serum , Agilent (250 µL) Référence : X0907				20 minutes
Soufflage		/				N/A
Étape 3	Anticorps primaire (dilution) (volume)	CD3 (1/100) (250 µL)	CD20 (1/200) (250 µL)	CK (AE1/AE3) (1/50) (250 µL)	Vimentine (1/4000) (250 µL)	30 minutes (Essais préalables en Annexe 2)
Rinçage		Wash Buffer 20X, Agilent Référence : K8007				Trempe rapide
						5 minutes
						5 minutes
Étape 4	Anticorps secondaire	EnVision + Dual Link System – HRP, Agilent (250 µL) Références: K4063 + K4061				30 minutes
Rinçage		Wash Buffer 20X, Agilent Référence : K8007				Trempe rapide
						5 minutes
						5 minutes
Étape 5	Révélation	Chromogene DAB+ Substrate , Agilent (250 µL) Référence : K3468				10 minutes
Rinçage		Eau distillée				Trempe rapide
Étape 6	Contre-coloration	Hématoxyline de Harris				1 minute
Rinçage		Eau distillée				Trempe rapide

La solution tampon de rinçage (Wash Buffer (20X) DAKO®, Agilent, référence K8007) pour les étapes du même nom était utilisée diluée au 1/20^{ème} dans de l'eau distillée.

Le protocole détaillé est le suivant :

2.5.1. Préparation des lames et fixation

Les lames (CPAF et calques), étaient fixées dans un bain d'acétone refroidi à 4°C, et laissées à incuber 3 minutes. Ensuite, après séchage à l'air libre, les lames étaient stockées au congélateur à -20°C.

2.5.2. Immunocytochimie

Les jours où les techniques d'immunocytochimie étaient planifiées, les lames étaient remises à température ambiante, puis un stylo *Dako-Pen-Agilent*® permettait de délimiter la zone où les étalements cellulaires étaient présents (*Figure 6*).

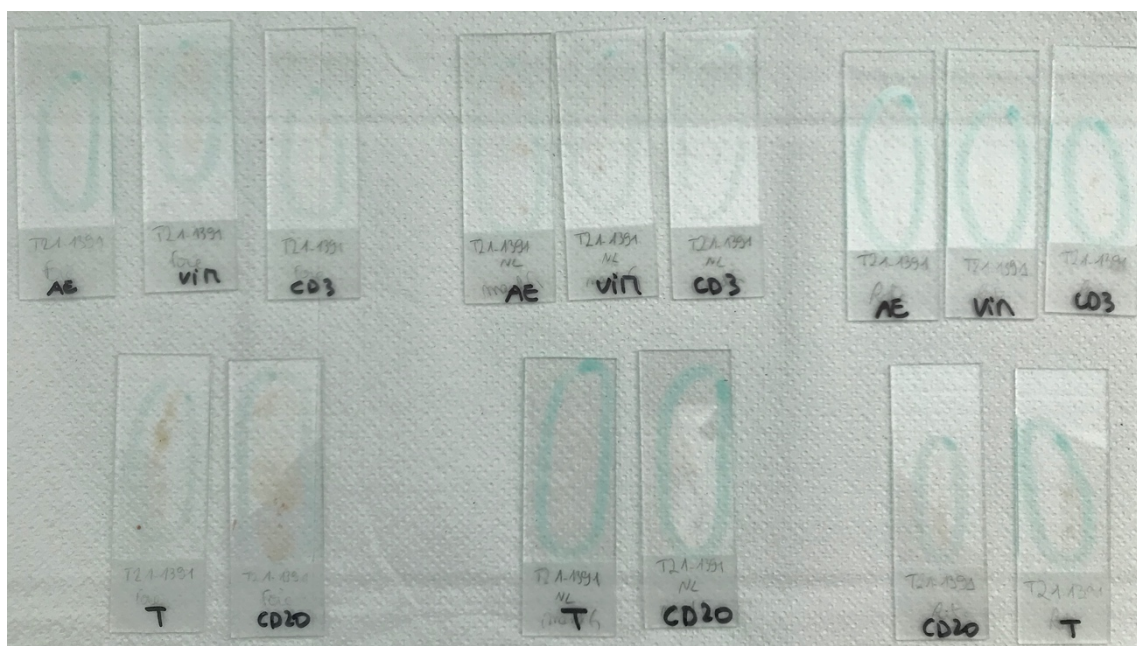


Figure 6: Application du stylo *Dako-Pen-Agilent* sur la lame en verre.

Les lames étaient ensuite rapidement immergées dans la solution tampon.

2.5.2.1. Étape 1 : Agent bloquant l'activité endogène de la peroxydase

Après avoir enlevé le tampon, l'agent bloquant était appliqué sur la lame de manière à recouvrir tout le spécimen, avant d'incuber 10 minutes. Après l'obtention des résultats sur les premiers spécimens marqués, la durée d'incubation a été prolongée de 5 minutes, afin d'atteindre 15 minutes de contact avec l'agent bloquant l'activité de la peroxydase endogène (*Annexe 2*).

Un rinçage doux à l'eau distillée suivi de deux passages dans des solutions tampons propres étaient réalisés. Afin d'éviter que les spécimens ne se dessèchent, ils restaient dans le dernier tampon jusqu'à l'étape suivante.

2.5.2.2. Étape 2 : Procédure de blocage des protéines endogènes

Le blocage des spécimens était effectué en appliquant 250 μ L de sérum normal de chèvre (même espèce que celle des anticorps secondaires), sur les lames en recouvrant complètement les spécimens. Les lames étaient ensuite placées dans une chambre humidifiée (*Figure 7*) pour 20 minutes d'incubation. Passé ce délai, l'excès de sérum autour des spécimens était retiré (à l'exception du contrôle négatif) avec une lingette.

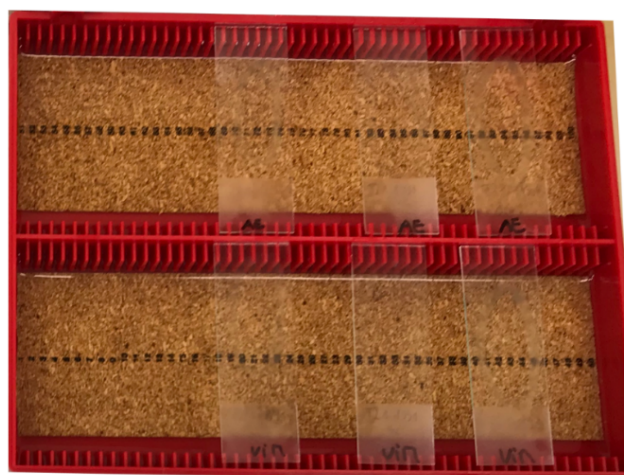


Figure 7: Chambre humidifiée réalisée en utilisant une boîte de lames dont le fond est rempli d'eau.

2.5.2.3. Étape 3 : Anticorps primaires et réactifs du contrôle négatif

La dilution des solutions d'anticorps primaires dans la solution de diluant (Ref S080981-2, Agilent, France) était réalisée au cours de l'étape 2.

Les lames étaient replacées dans la chambre humidifiée, puis 250 µL d'anticorps primaire était déposé sur chaque spécimen, en évitant de laisser les lames se dessécher.

Le témoin négatif était recouvert de 250 µL de solution de diluant d'anticorps avec 10% de sérum de chèvre.

Ensuite, les lames étaient incubées 30 minutes et rincées deux fois. Pour certains spécimens, des tentatives de durée d'incubation réduite à 20 minutes ont été tentées (*Annexe 2*).

2.5.2.4. Étape 4 : Anticorps secondaire : Polymère couplé à la peroxydase

Après fixation des anticorps primaires et rinçages avec la solution tampon, l'excès de tampon autour des spécimens était enlevé, puis l'anticorps secondaire (polymère anti souris et anti-lapin marqué à la peroxydase) était appliqué pendant 30 minutes. Les lames étaient rincées de la même façon qu'à l'étape précédente, avant d'être placées dans un bain de tampon pendant 5 minutes.

2.5.2.5. Étape 5 : Étape de révélation

La solution de chromogène (Diamino-Benzidine (DAB)) était préparée pendant l'étape 4. La préparation de 1 mL de solution qualifiée « substrat-chromogène DAB+ » était préparée en ajoutant 1 goutte de DAB à 1 mL de liquide « substrat » et permettait de traiter un maximum de 5 lames. Cette solution restait stable environ 5 jours entre 2 et 8°C, et devait être vigoureusement mélangée avant utilisation.

Pour l'étape de révélation finale avec la DAB, la solution de « substrat-chromogène » était déposée et laisser incuber 10 minutes.

2.5.2.6. Étape 6 : Contre-coloration nucléaire

À la suite du rinçage en fin de révélation, les lames étaient immergées dans un bain d'hématoxyline de Harris aqueuse pendant 1 minute, avant de les rincer doucement à l'eau distillée et les monter avec une lamelle.

2.6. Lecture et interprétation des lames

2.6.1. Contrôle de la qualité des spécimens

Avant l'étape d'immunocytochimie, une lame de chaque organe ponctionné était colorée au MayGrünwald Giemsa (MGG), et observée au microscope (Eclipse 50i, Nikon, Kobé, Japon), à faible grossissement (X200) puis à fort grossissement (X400). L'objectif était d'évaluer la qualité des spécimens, en vérifiant leur cellularité, le degré de préservation des cellules, et la présence d'une éventuelle contamination sanguine.

2.6.2. Contrôle des témoins négatifs

Lors de la réalisation des réactions immunocytochimiques, sur les 6 lames confectionnées par organe, une permettait l'analyse cytologique traditionnelle (May-Grünwald Giemsa), quatre étaient destinées aux immunomarquages, et la dernière servait pour le contrôle négatif. Pour cette dernière, la technique d'immunomarquage était comparable au protocole décrit à l'exception de l'omission de l'anticorps primaire à l'étape 3.

Les témoins négatifs étaient observés avant d'étudier les immunomarquages. L'objectif était de vérifier l'absence complète de marquage. Dans le cas contraire, l'interprétation des autres lames de la même série n'était plus possible.

2.6.3. Interprétation

Toutes les lames ont été observées avec un microscope photonique (Eclipse 50i, Nikon, Kobé, Japon, grossissements x200, x400, et x1000 sous immersion) selon la même procédure à savoir les observations successives de : 1/ lame colorée au MGG afin d'évaluer la qualité du prélèvement et analyser les caractéristiques cytologiques des cellules présentes, 2/ lame témoin contrôle négatif afin de vérifier l'absence de marquage, puis 3/ les lames marquées (CD3, CD20, Cytokératine, Vimentine).

Chaque lame était d'abord parcourue dans sa totalité à faible grossissement. Ensuite, les cellules marquées étaient examinées aux grossissements plus élevés.

Plusieurs points étaient pris en compte :

- Absence de bruit de fond. En effet celui-ci peut faire apparaître un léger marquage, qui, lorsqu'il est trop important, rend la lecture et l'interprétation difficiles voire impossibles.
- Nature des cellules marquées (le marquage correspondait-il à l'anticorps testé ?)
- Type de marquage (cytoplasmique, membranaire, et/ou nucléaire).

3. Résultats

Pour la grande majorité des lames étudiées, les témoins négatifs étaient de qualité, sans aucun marquage et avec une absence de bruit de fond. Pour les rares contrôles négatifs pour lesquels un faible immunomarquage était visible, ceux-ci étaient considérés ininterprétables, et les autres lames correspondant au même animal n'étaient pas étudiées.

Pour choisir la dilution des anticorps étudiés, nous nous sommes basés sur les dilutions utilisées dans les travaux de l'université de Purdue. Pour le CD3, le CD20, et la Cytokératine, les dilutions d'anticorps choisies donnaient des résultats corrects, tandis que pour la vimentine, des ajustements ont été nécessaires, car le marquage cellulaire était trop puissant. Finalement, la dilution retenue était de 1/4000.

Les résultats généraux sont compilés en Annexe 3.

- CD3 et CD20 : les cellules marquées étaient des cellules rondes, au fort rapport nucléocytoplasmique évoquant des lymphocytes. Le marquage cellulaire était cytoplasmique et membranaire pour ces deux anticorps (*Figures 8 à 14*). Or, un nœud lymphatique contient des lymphocytes B dans les follicules du cortex superficiel et dans la médulla, et des lymphocytes T dans le tissu interfolliculaire du cortex superficiel, dans le paracortex et dans la médulla. Ainsi, selon l'endroit où l'on réalise la cytoponction dans le nœud lymphatique, on peut obtenir des lymphocytes B, des lymphocytes T, ou bien les deux à la fois. Dans cette étude, les spécimens issus de nœuds lymphatiques étaient fortement positifs pour l'anticorps anti-CD3, l'anticorps anti CD20, ou pour les deux anticorps à la fois. La rate est également un tissu riche en lymphocytes. En effet, ceux-ci sont contenus dans la pulpe blanche, avec des lymphocytes T dans le manchon périartériel et la zone marginale, et des lymphocytes B dans le follicule secondaire et la zone marginale. Comme pour les spécimens issus de nœuds lymphatiques, ceux provenant de rates présentaient tous des cellules marquées positivement aux anticorps anti-CD3 et anti-CD20. Enfin, dans le foie, des vaisseaux sanguins étant présents dans les espaces portes, mais également au sein des lobules hépatiques, il est possible de trouver des cellules sanguines en réalisant des cytoponctions. Ainsi des lames issues de foies peuvent comporter des lymphocytes T et B, et donc avoir des cellules marquées positivement aux anticorps anti-CD3 et CD20, ce qui s'est révélé vrai dans notre étude, où quelques cellules positives pouvaient être observées, en plus faible quantité, sur les lames issues de ponctions hépatiques [4][31].
- Vimentine : un marquage cytoplasmique de cellules aux prolongements cytoplasmiques grêles et allongés a été observé dans les cytoponctions de rate et de nœuds lymphatiques évoquant des cellules dendritiques à interdigitées. (*Figures 15 à 18*). Néanmoins, sur de nombreux spécimens, le marquage ciblait également des cellules rondes (*Figure 16*), rendant l'interprétation difficile.
- Cytokératine : le marquage des cellules épithéliales était cytoplasmique. Sur les spécimens hépatiques, l'ensemble des hépatocytes étaient marqués positivement (*Figure 19*). De même, lors de contamination des spécimens par des squames, ces derniers apparaissaient marqués.

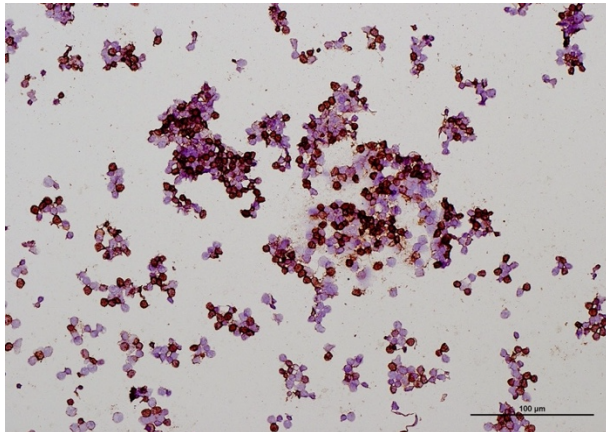


Figure 9: Rate, chat (expression du CD3, x200) : marquage d'une population de cellules rondes à fort rapport nucléoplasmique évoquant des lymphocytes.

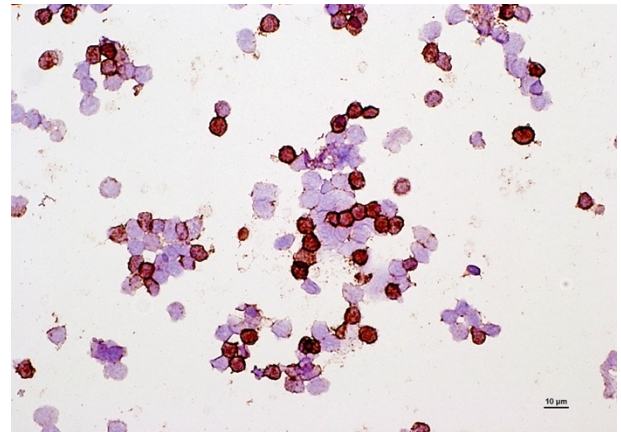


Figure 8: Rate, chat (expression du CD3, x400): marquage cytoplasmique et membranaire des lymphocytes T.

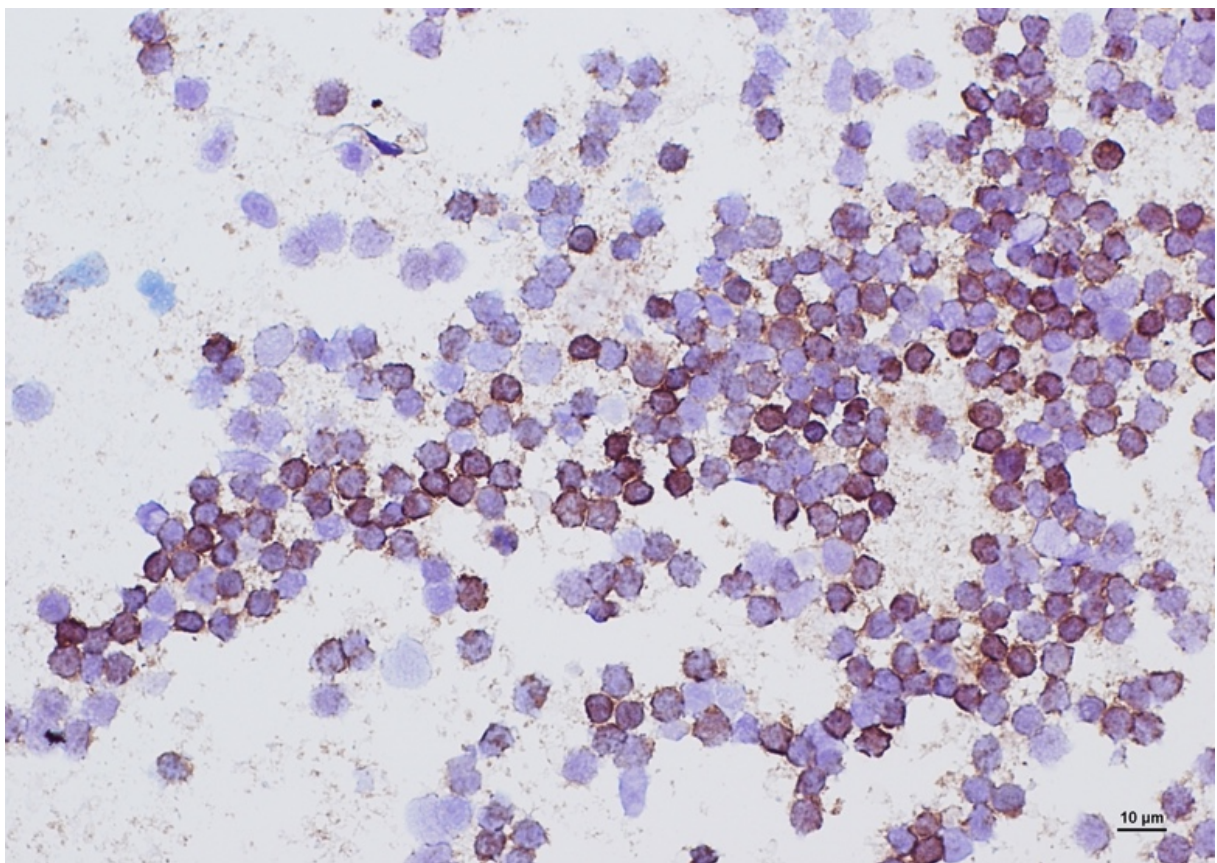


Figure 10: Nœud lymphatique, chien (expression du CD3, x400): marquage cytoplasmique et membranaire de lymphocytes.

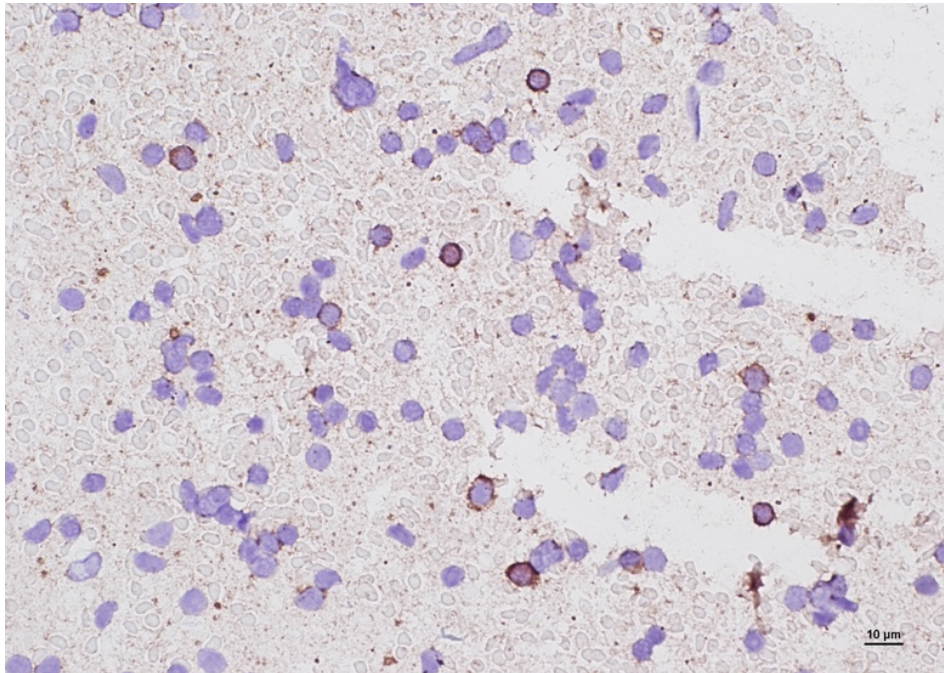


Figure 11: Rate, chat (expression du CD20, x400): marquage d'une population de cellules rondes à fort rapport nucléoplasmique évoquant des lymphocytes.

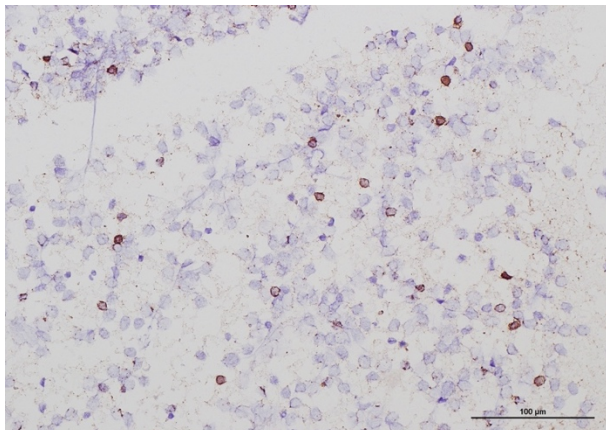


Figure 13: Rate, chien (expression du CD20, x200): marquage d'une population de cellules rondes à fort rapport nucléoplasmique évoquant des lymphocytes.

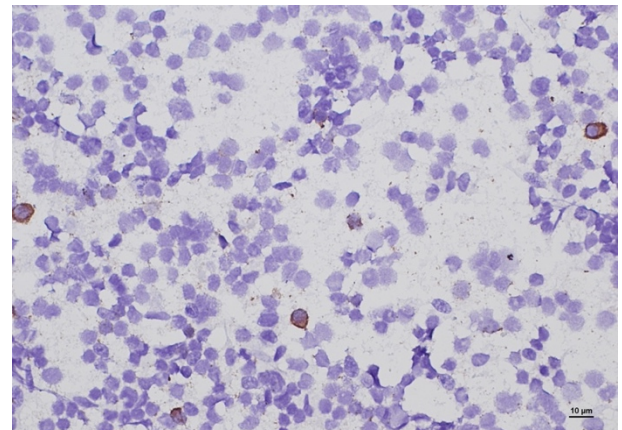


Figure 12: Rate, chien (expression du CD20, x400): marquage cytoplasmique et membranaire de lymphocytes.

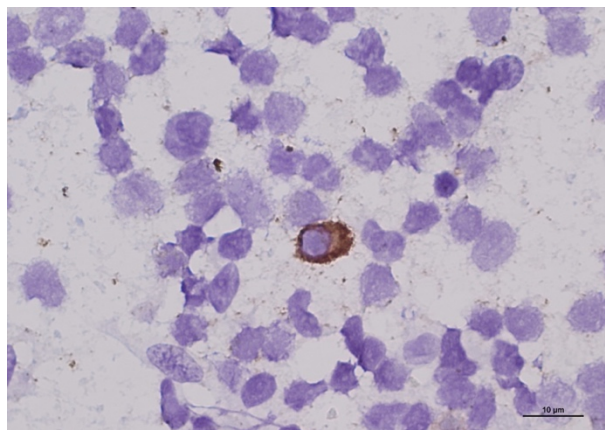


Figure 14: Nœud lymphatique, chat (expression du CD20, x1000): marquage cytoplasmique et membranaire de lymphocytes.

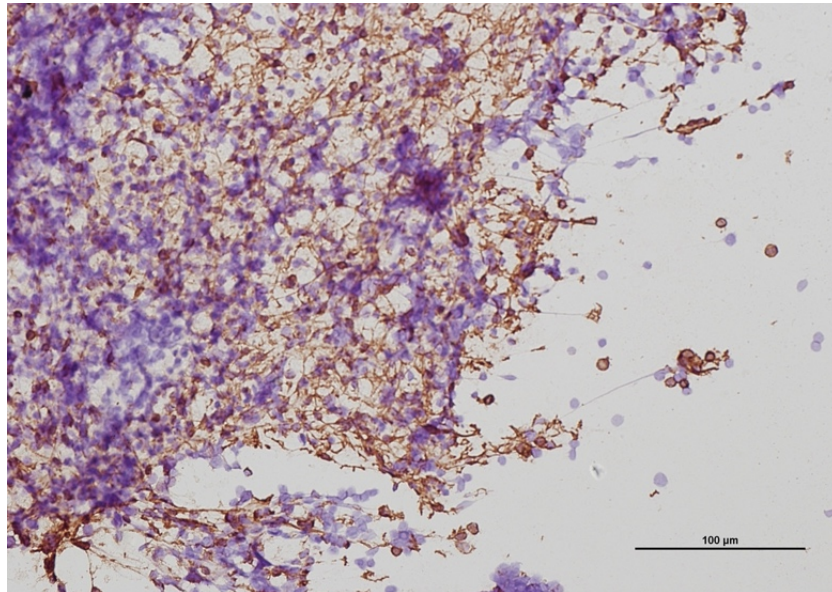


Figure 15: Rate, chat (expression de la Vimentine, x200): marquage d'une population de cellules aux prolongements cytoplasmiques dendritiques semblant former un réseau et de quelques cellules rondes.

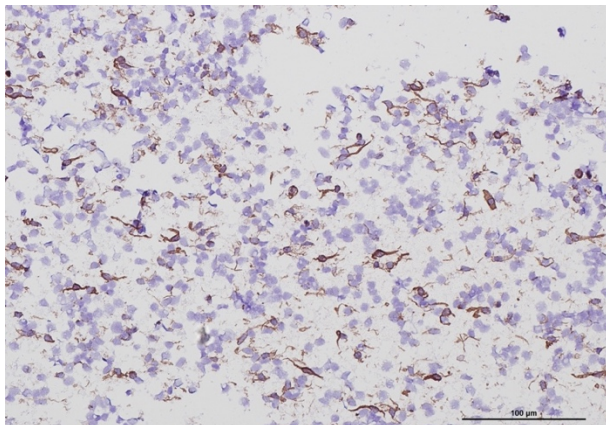


Figure 16: Rate, chien (expression de la Vimentine, x200): marquage cytoplasmique d'une population de cellules fusiformes.

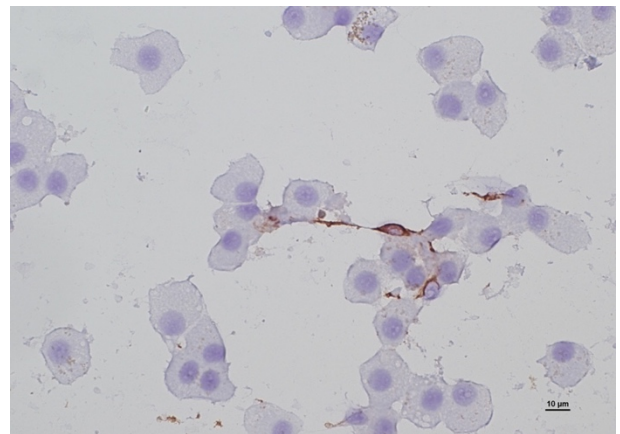


Figure 17: Foie, chien (expression de la Vimentine, x400): marquage cytoplasmique de quelques cellules de morphologie dendritique à côté des hépatocytes.

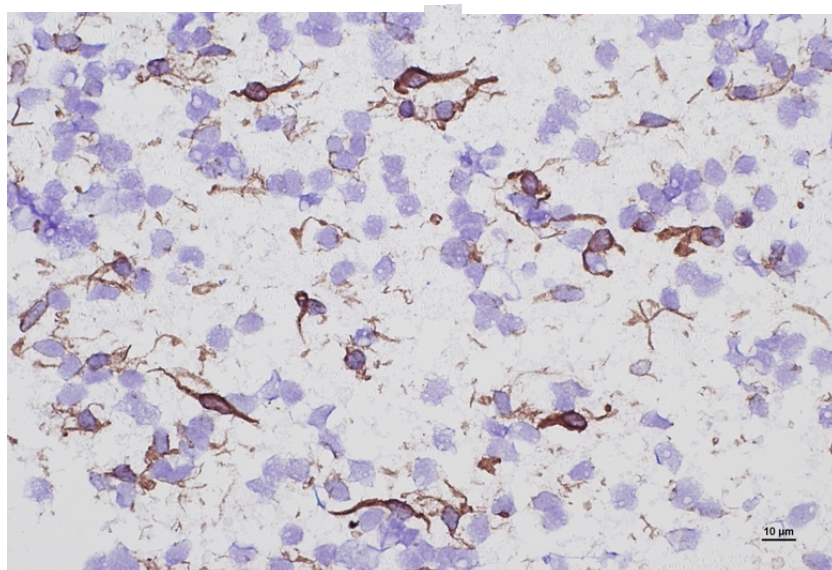


Figure 18: Rate, chien (expression de la Vimentine, x400): marquage d'une population de cellules fusiformes aux prolongements cytoplasmiques effilé.

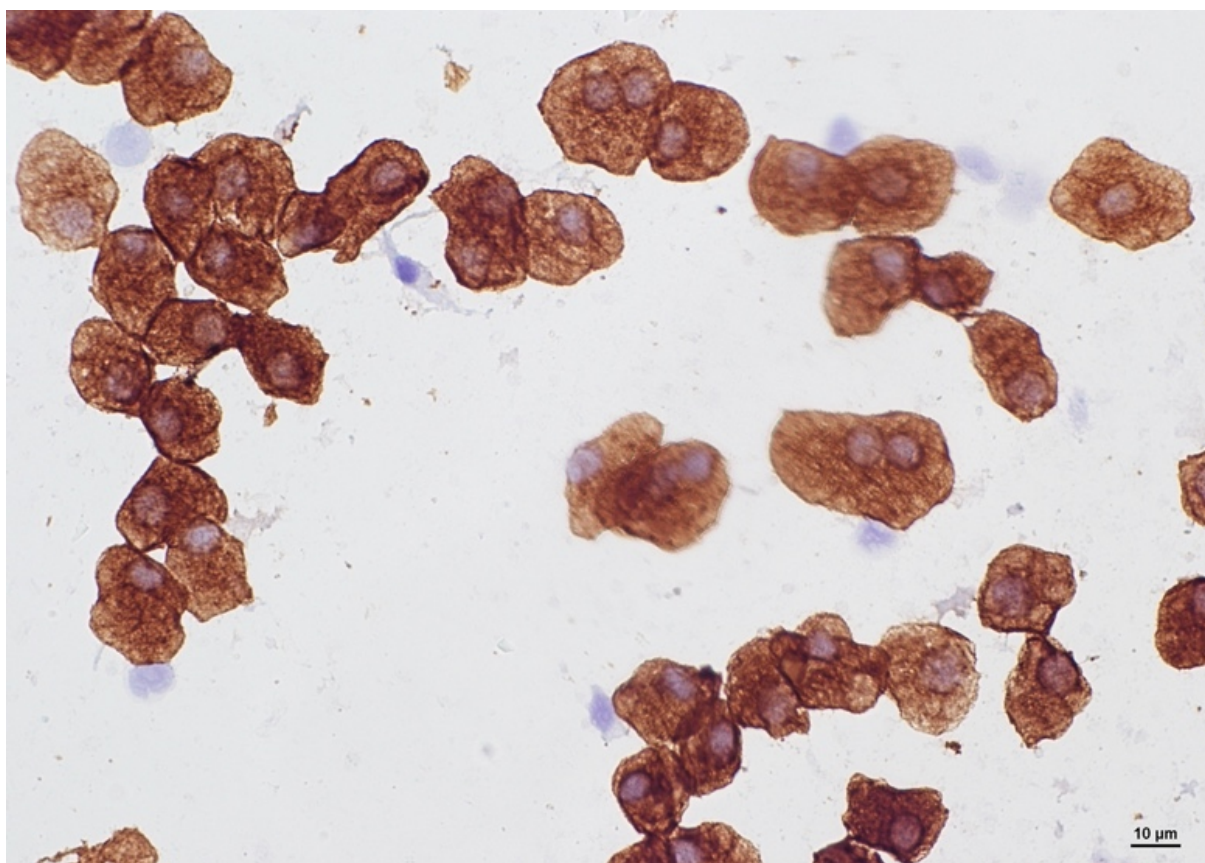


Figure 19: Foie, chien (expression de la Cytokératine AE1/AE3, x400): marquage cytoplasmique des hépatocytes.

4. Discussion

L'étude expérimentale réalisée visait à établir un protocole d'immunocytochimie simple et standardisé pouvant être ensuite utilisé en routine au Laboratoire Central de Biologie Médicale de l'ENVT. Les résultats sont globalement satisfaisants et corrélés à ceux attendus dans la littérature pour les anticorps anti-CD3, anti-CD20, et anti-cytokératine. L'anticorps anti-vimentine donne des résultats qui sont cependant insatisfaisants en l'état.

Cette étude expérimentale présente une limite liée à la confection des spécimens à partir de cadavres de carnivores domestiques. Lors des premiers essais, il avait été décidé de réaliser des cytoponctions avec aspiration à l'aiguille fine. Mais, en observant les premières lames au microscope, la qualité des cytoponctions de foie et de rate semblait correcte, tandis que les étalements de nœuds lymphatiques étaient de mauvaise qualité, avec une quantité importante de noyaux nus. Il est vraisemblable que le nœud

lymphatique, organe très sensible à l'autolyse, soit à l'origine de cette observation. Il a donc été décidé de réaliser des calques par impression afin d'éviter le « traumatisme » lié à la ponction/aspiration et à l'étalement des cellules lymphoïdes déjà fragilisées. Cette adaptation technique a amélioré la qualité des spécimens. Il est à remarquer que la quasi-totalité des spécimens (aspirations à l'aiguille fine et calques par impression) a été réalisée par une seule personne ; le biais lié à l'opérateur reste donc très faible. Une autre conséquence de travailler sur des cadavres, même si les animaux étaient décédés dans un délai maximal de 48h, concerne la dessiccation rapide des organes suite à l'ouverture du cadavre. La ponction ou le calque était plus difficile, et ceci était particulièrement vrai pour les aspirations spléniques de chats, où la finesse de l'organe rendait la collection de matériel délicate. Enfin, pour chaque organe prélevé, il fallait réaliser un jeu de 6 lames. Idéalement, les lames utilisées pour la coloration usuelle et l'immunocytochimie devraient être obtenues à partir de la même aspiration mais dans notre cas, suite à la pauvreté de matériel obtenu dans la seringue, nous réalisons une cytoponction pour chaque lame. Même s'il s'agissait du même opérateur et du même organe ponctionné, des variations de qualité et de richesse cellulaire existaient d'un étalement à l'autre. Ainsi, dans certains cas, la lame colorée au May-Grünwald Giemsa avait une cellularité riche alors que certaines lames immunomarquées provenant du même organe étaient très pauvres, et inversement.

Enfin, le manque de cadavres disponibles suite au refus des propriétaires d'autoriser l'autopsie de leurs animaux a limité la récolte de spécimens sans compter l'élimination de carnivores dont les organes étaient déjà trop autolysés.

La mise au point de la technique immunocytochimique a débuté par la recherche de la dilution et la durée d'incubation optimales de chacun des quatre anticorps utilisés. Pour que cela soit possible, nous avons augmenté le nombre d'étalement réalisé (10 lames au lieu de 6), afin d'avoir un nombre suffisant de spécimens pour effectuer nos essais. Nous avons commencé par tester les dilutions indiquées dans les travaux de Rose Raskin [27]. Si les résultats étaient d'emblée très convaincants pour les anticorps dirigés contre le CD3, le CD20 et la cytokeratine, il n'en était pas de même pour l'anticorps anti-vimentine, pour lequel un temps plus long a été nécessaire afin de tester plusieurs dilutions et de retenir une dilution au 4000^{ème}. A l'issue des premiers immunomarquages,

des ajustements des divers temps d'incubation ont été réalisés (Annexe 2) ; le protocole définitif pour l'ensemble des anticorps figurant dans le Tableau 4.

La seconde limite de ce travail est le nombre restreint d'anticorps testés pour permettre un diagnostic de néoplasies chez le chien et le chat. En effet, la volonté était de nous concentrer sur la différenciation des lignées lymphoïde, épithéliale, et mésenchymateuse dans cette étude que l'on pourrait qualifier d'étude pilote. Dans cette même optique, le choix des organes (foie, rate, nœud lymphatique) permettait un marquage des quatre anticorps sur au moins un organe chacun. En effet, les anticorps anti-CD3 et anti-CD20 sont connus dans la littérature pour marquer respectivement des lymphocytes T et B. Cela s'est révélé être vrai dans notre étude, puisque tous les spécimens issus de nœuds lymphatiques et de rate présentaient une grande quantité des cellules marquées à l'anticorps anti-CD3, et une majorité présentait également des cellules marquées à l'anticorps anti-CD20. Le marquage était cohérent avec celui décrit dans la littérature, car il s'agissait d'un marquage cytoplasmique et membranaire de cellules rondes à fort rapport-nucléocytoplasmique.

Cette étude a donc permis de montrer que notre protocole était adapté pour utiliser les anticorps anti-CD3 et anti-CD20, déjà validés en immunocytochimie, comme marqueurs du cytoplasme et de la membrane des lymphocytes T et B chez le chien et le chat.

L'anticorps anti-cytokératine, quant-à-lui, est connu pour marquer le cytoplasme des cellules épithéliales. Dans notre étude, le marquage n'était positif que sur les hépatocytes, et sur des squames parfois aperçus sur d'autres spécimens par contamination. Ici encore, les résultats de cette étude étaient en corrélation avec les travaux publiés en immunocytochimie chez le chien et le chat, et permettaient de valider notre protocole d'immunomarquage pour l'utilisation de l'anticorps anti-cytokératine.

L'anticorps anti-vimentine a été validé en immunocytochimie comme marqueur des cellules mésenchymateuses et des fibres de collagène [22]. Dans notre étude, un marquage positif du cytoplasme était observé sur des cellules évoquant des cellules dendritiques ou interdigitées, et notamment sur leurs prolongements cytoplasmiques, fortement marqués. Mais, sur certains spécimens, des cellules rondes étaient également

marquées positivement. Or, selon *Dabbs* et *Nayak*, l'anticorps anti-vimentine reconnaîtrait dans les tissus sains, les cellules mésenchymateuses (cellules endothéliales et fibroblastes), mais aussi les cellules musculaires lisses de la paroi des vaisseaux sanguins, les cellules stromales endométriales, ainsi que certaines cellules sanguines et immunitaires dont les macrophages, les granulocytes neutrophiles, les plaquettes sanguines, les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans, les mélanocytes, et les lymphocytes [12][22]. Le marquage résultant de l'anticorps anti-vimentine semble donc peu spécifique, et cela permettrait d'expliquer pourquoi des cellules rondes sont marquées positivement sur certains spécimens de rate et de nœud lymphatique dans notre étude. Une autre hypothèse possible à ce marquage inattendu est la détérioration cellulaire. En effet, les cellules marquées pourraient être des cellules interdigitées ou dendritiques ayant perdu leurs prolongations cytoplasmiques au cours des étapes de prélèvement, de séchage, de stockage, ou encore d'immunomarquage.

Pour l'instant, le marquage cellulaire de l'anticorps anti-vimentine reste à mieux caractériser. Pour ce faire, il sera nécessaire d'utiliser d'une part de nouveaux marqueurs pour compléter le typage cellulaire comme des marqueurs leucocytaires (CD45), dendritiques (CD11d), endothéliaux (CD31, CD34) mais aussi élargir la nature des spécimens à ponctionner, en ajoutant par exemple les liquides d'épanchement.

Le prolongement de cette étude serait de poursuivre la différenciation immunocytochimique des principales tumeurs du chien et du chat en incluant de nouveaux marqueurs. Le panel de base pour les carnivores domestiques est peu abondant comparativement à ce qui existe chez l'homme mais comprend des marqueurs épithéliaux (pancytokératines) et panleucocytaires (CD45 ou CD18), des marqueurs de différenciation mélanocytaire (Melan A ou S100) et mésenchymateuse (vimentine).

CONCLUSION

La technique d'immunocytochimie, déjà utilisée depuis plus de vingt ans en médecine humaine et considérée comme outil puissant d'aide au diagnostic cytologique, est maintenant utilisée en cytologie diagnostique vétérinaire, et fournit des informations supplémentaires sur les critères cytomorphologiques. L'étude expérimentale réalisée ici visait à établir un protocole d'immunocytochimie standardisé pouvant être utilisé en routine au laboratoire de Biologie Médicale de l'ENVT.

Bien que des ajustements soient encore à réaliser, notamment au niveau du marquage de l'anticorps anti-vimentine, le protocole mis en place dans ce travail semble donner des résultats globalement satisfaisants et corrélés à ceux attendus dans la littérature lorsqu'il est utilisé avec les anticorps anti-CD3, anti-CD20, et anti-cytokératine. Il sera également intéressant de le tester conjointement à un panel d'anticorps plus large et une variété plus grande de spécimens afin d'une part de préciser le contingent cellulaire qu'il met en évidence et d'autre part d'élargir la caractérisation des lignées cellulaires du diagnostic immunocytochimique tumoral chez le carnivore domestique.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Nathalie BOURGES ABELLA, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directrice de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Charline FAUQUET** intitulée « MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'IMMUNOCYTOCHIMIE POUR L'AIDE AU DIAGNOSTIC CYTOLOGIQUE DES NEOPLASIES CHEZ LE CHIEN ET LE CHAT » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 20/09/2021
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeure Nathalie BOURGES ABELLA



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
M. Pierre SANS



Vu :
La Présidente du jury
Professeure Monique COURTADE SAÏDI



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul
Sabatier
Monsieur Jean-Marc BROTO
Par délégation, le Doyen de la faculté de
Médecine de Toulouse-Rangueil
Monsieur Elie SERRANO



Mme Charline FAUQUET
a été admise(e) sur concours en : 2016
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le: 06/07/2020
a validé son année d'approfondissement le: 15/07/2021
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] ABATI, A., FETSCH, P., FILIE, A. If cells could talk. The application of new techniques to cytopathology. *Clinics in Laboratory Medicine* [en ligne], 1998, vol.18, n°3, p.561–583. [https://doi.org/10.1016/S0272-2712\(18\)30163-X](https://doi.org/10.1016/S0272-2712(18)30163-X) (consulté le 15/08/2021).
- [2] ALCOVER, A., ALARCON, B., DI BARTOLO, V. Cell Biology of T Cell Receptor Expression and Regulation. *Annual Review of Immunology* [en ligne], 2018, vol.26, n°1, p.85-107. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053429> (consulté le 15/09/2021).
- [3] AZUMI, N., BATTIFORA, H. Azumi, N., & Battifora, H. (1987). The Distribution of Vimentin and Keratin in Epithelial and Nonepithelial Neoplasms: A Comprehensive Immunohistochemical Formalin- and Alcohol-Fixed Tumors. *American Journal of Clinical Pathology* [en ligne], 1987, vol.88, n°3, p.286-296. <https://doi.org/10.1093/ajcp/88.3.286> (consulté le 01/09/2021).
- [4] BACHA, W.L., BACHA L.L. *Color Atlas of Veterinary Histology*. Third Edition. WILEY BLACKWELL, 2013. 342 p. ISBN 978-0-470-95851-3
- [5] BARGER, A.M., MACNEILL, A.L. *Small Animal Cytologic Diagnosis*. Taylor & Francis Group, 2017. 920 p. ISBN 978-1-4822-2575-4
- [6] BAUER, N. Cytological Collection Techniques and Sample Preparation In DUNN, J. *Manual of Diagnostic Cytology of the Dog and Cat*. WILEY Blackwell, 2014. P 1-15. ISBN 9780470658703.
- [7] BOSLY, A. Anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) dans les maladies hématologiques et les affections auto-immunes. *Réanimation* [en ligne], 2006, vol. 15, p.270-277. Disponible sur https://www.srlf.org/wp-content/uploads/2015/11/0608-Reanimation-Vol15-N4-p270_277.pdf (consulté le 12/06/2021).

- [8] CANIATTI, M., ROCCABIANCA, P., SCANZIANI, E., *et al.* Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Veterinary pathology Pathology* [en ligne], 1996, vol. 33, n°2, p.204-212. <https://doi.org/10.1177/030098589603300210> (consulté le 20/03/2021).
- [9] CONGY-JOLIVET, N., CARTRON, G. L'antigène CD20 : structure, fonctions et ciblage, *Correspondances en Onco-Hématologie* [en ligne], 2014, vol. 9, n°3, p. 104–108. <https://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/21582.pdf> (consulté le 30/08/2021).
- [10] COURTADE-SAIDI, M., DUPRE, M.P. L'immuno-cytochimie : une aide au diagnostic cytologique. *Annales de pathologie*, 2012, vol. 32, p.433-437. ISSN 0242-6498.
- [11] COWELL, R.L., VALENCIANO, A.C. *Cowell and Tyler's Diagnostic cytology and hematology of the Dog and Cat*. Fifth Edition. MOSBY ELSEVIER, 2020. 576 p. ISBN 9780323533140.
- [12] [DABBS] Am J Clin Pathol 1991;96:669, Dabbs: Diagnostic Immunohistochemistry - Theranostic and Genomic Applications, 5th Edition, 2018.
- [13] DENDA, T., KAMOSHIDA, S., KAWAMURA, J., *et al.* Optimal antigen retrieval for ethanol-fixed cytologic smears. *Cancer Cytopathology* [en ligne], 2012, vol. 120, n°3, p.167-176. <https://doi.org/10.1002/cncy.21192> (consulté le 04/04/2021).
- [14] EICHNER, R., BONITZ, P., SUN, T.T. Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point and mode of expression. *The Journal of Cell Biology* [en ligne], 1984, vol. 98, n°4, p.1388-1396. <https://doi.org/10.1083/jcb.98.4.1388> (consulté le 01/09/2021).

[15] EWING, T.S., PIEPER, J.B., STERN, A.W. Prevalence of CD20+ cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma in dogs: a retrospective analysis of 24 cases (2011-2018) in the USA. *Veterinary Dermatology* [en ligne], 2018. <https://doi.org/10.1111/vde.12703> (consulté le 13/06/2021).

[16] JUBALA, C.M., WOJCIESZN, J.W., VALLI, V.E.O. et al. CD20 Expression in Normal Canine B Cells and in Canine non-Hodgkin Lymphoma. *Veterinary Pathology* [en ligne], 2018, vol. 42, n°4, p.468–476. <http://doi.org/10.1354/vp.42-4-468> (consulté le 10/08/2021).

[17] KU, C.K., KASS, P.H., CHRISTOPHER, M.M. Cytologic-histologic concordance in the diagnosis of neoplasia in canine and feline lymph nodes: a retrospective study of 367 cases. *Veterinary and Comparative Oncology* [en ligne], 2016, vol.15, n°4, p.1206-1217. <https://doi.org/10.1111/vco.12256> (consulté le 03/07/2021).

[18] LANORE, D., TRUMEL, C., LAPVSO : *Comment réaliser une cytoponction à l'aiguille fine, un carottage à l'aiguille, des calques par impression, un cytobrossage ?* [en ligne]. Disponible sur : <https://www.lapvso.com/comment-realiser-une-cytoponction-a-laiguille-fine-un-carottage-a-laiguille-des-calques-par-impression-un-cytobrossage/> (Page consultée le 01/03/2021).

[19] LISTROM, M.B., DALTON, L.W. Comparison of Keratin Monoclonal Antibodies MAK-6, AE1:AE3, and CAM-5.2. *American Journal of Clinical Pathology* [en ligne], 1987, vol.88, n°3, p.297–301. <https://doi.org/10.1093/ajcp/88.3.297> (consulté le 10/06/2021).

[20] MANDAL, P.K., MONDAL, S.K., ROY, S. et al. Immunocytochemistry: It's role in diagnosis of undifferentiated neoplasms by fine needle aspiration cytology. *Journal of Cytology* [en ligne], 2013, vol.30, n°2, p.121-124. <https://www.jcytol.org/text.asp?2013/30/2/121/112656> (consulté le 01/09/21).

[21] NAKAGUN, S., HORIUCHI, N., WATANABE, K. et al. CD3 and CD20 co-expression in a case of canine peripheral T-cell lymphoma with prominent cardiac and

peripheral nerve involvement. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* [en ligne] 2018, p.1-5. ISSN 104063871879476–. <https://doi.org/10.1177/1040638718794765> (consulté le 10/08/21).

[22] NAYAK, M.T., SINGH, A., DESAI, R.S. *et al.* Immunohistochemical Analysis of Vimentin in Oral Submucous Fibrosis. *Journal of Cancer Epidemiology* [en ligne], 2013, p.1-6. ID 549041. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/549041>

[23] PRIEST, H.L., HUME, K.R., KILLICK, D. *et al.* The use, publication and future directions of immunocytochemistry in veterinary medicine: a consensus of the Oncology-Pathology Working Group. *Veterinary and Comparative Oncology* [en ligne], 2016, vol.15, n°3, p.868-880. <https://doi.org/10.1111/vco.12228> (consulté le 01/09/2021).

[24] RAMOS-VARA, J.A., MILLER, M.A. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along. *Veterinary Pathology* [en ligne], 2013, vol. 51, n°1, p.42–87. <http://vet.sagepub.com/content/early/2013/10/15/0300985813505879> (consulté le 03/04/2021).

[25] RASKIN, R.E., DENNY, J.M. *Canine and Feline Cytology: A color atlas and interpretation guide*. Third Edition. ELSEVIER, 2016. 543 p. ISBN 978-1-4557-4083-3.

[26] RASKIN R. *Immunocytochemical Staining Protocol* [en ligne]. Disponible sur <https://immunocytopurdue.webs.com> (Page consultée le 11/03/2021).

[27] RASKIN, R.E., VICKERS, J., WARD, J.G., *et al.* Optimized immunocytochemistry using leukocyte and tissue markers on Romanowsky-stained slides from dogs and cats. *Veterinary clinical pathology* [en ligne], 2019, vol.00, p.1-10. <https://doi.org/10.1111/vcp.12759> (consulté le 11/03/2021).

[28] SAWA, M., YABUKI, A., MIYOSHI, N. *et al.* A simple and rapid immunocytochemical technique for detection of cytokeratin, vimentin, and S-100

protein in veterinary diagnostic cytology. *Research in Veterinary Science* [en ligne] 2020, vol. 93, n°3, p.1341–1345. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.03.013>.

[29] SREBOTNIK KIRBIS, I., RODRIGES ROQUE, R., BONGIOVANNI, M. *et al.* Immunocytochemistry practices in European cytopathology laboratories—Review of European Federation of Cytology Societies (EFCS) online survey results with best practice recommendations. *Cancer Cytopathology* [en ligne], 2020, vol.128, p.759-766. <https://doi.org/10.1002/cncy.22311> (consulté le 29/07/2021).

[30] SKOOG, L., TANI, E. Immunocytochemistry : an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology* [en ligne], 2011, vol. 22, n°4, p.215-229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2011.00887.x> (consulté le 02/04/2021).

[31] STEVENS, A., LOWE, J. *HISTOLOGIE*. EDITIONS PRADEL, 1993. 378p. ISBN 2-907516-35-3.

[32] TIZARD, I.R. *Veterinary immunology: an introduction*. 7^{ème} Edition. Philadelphia: Saunders, 2004. 512 p. ISBN 9780721601366.

[33] VALLI, V., PETERS, E., WILLIAMS, C., *et al.* Optimizing methods in immunocytochemistry: one laboratory's experience. *Veterinary Clinical Pathology* [en ligne], 2009, vol. 38, no. 2, p.261–269. ISSN 0275-6382. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2009.00119.x> (consulté le 25/03/2021).

[34] WOODCOCK-MITCHELL, J., EICHNER, R., NELSON, W.G. *et al.* Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *The Journal of Cell Biology* [en ligne], 1982, vol.95, n°2, p.580–588. <https://doi.org/10.1083/jcb.95.2.580>

ANNEXES

Annexe 1: Informations sur les animaux prélevés aux autopsies.

N° clovis	Date de la mort	Espèce	Race	Sexe	Age	Date du prélèvement	N° autopsie	Nature de la mort	Cause	Conclusions à l'autopsie
T21-239	14/01/21	Chat	Européen	Femelle stérilisée	18 ans	14/01/21	5	Euthanasie	Détresse respiratoire non investiguée	Forte suspicion de processus tumoral laryngé
T21-442	24/01/21	Chien	Montagne des Pyrénées	Mâle castré	1,5 ans	25/01/21	8	Euthanasie	Tumeur osseuse avec métastases pulmonaires	Ostéosarcome avec métastases multicentriques
T16-394	22/01/21	Chien	Dogue allemand	Mâle	6 ans	26/01/21	12	Euthanasie	Discocondylite en C7-T1 et compression médullaire C6-C7	Hyperplasie bénigne de la prostate modérée, endocardiose modérée, absence de lésion macroscopique expliquant le tableau clinique
T21-1088	24/02/21	Chien	Golden retriever	Mâle	4 mois	25/02/21	33	Naturelle	Arrêt cardio-respiratoire	Résultats de l'autopsie compatibles avec un syndrome de mort subite probablement dû à un dysfonctionnement du système nerveux
T21-1005	23/02/21	Chat	Européen	Mâle castré	6 ans	25/02/21	34	Euthanasie	AVP: fractures multiples du crâne	Multiples fractures des os du crâne avec lésions hémorragiques sévères et œdème cérébral associés compatible avec un traumatisme récent (AVP)
T20-4334	01/03/21	Chien	Croisé Griffon	Mâle castré	15 ans	02/03/21	41	Euthanasie	Œdème aigu du poumon et ascite	<ul style="list-style-type: none"> - Dilatation modérée à sévère, diffuse, des 4 compartiments cardiaques (Cardiomyopathie dilatée sévère) avec endocardiose mitrale marquée - Congestion passive chronique marquée à sévère du foie et des poumons et transsudats tricavitaires

T21-1315	06/03/21	Chien	Croisé	Mâle	13 ans	02/03/21	45	Euthanasie	Maladie rénale chronique	Résultats de l'autopsie compatibles avec une néphropathie chronique conduisant à une urémie (ulcères linguaux et foyers de minéralisation du pylore) / Phéochromocytome
T21-1391	11/03/21	Chat	Européen	Femelle stérilisée	8 ans	12/03/21	48	Euthanasie	Oedème aigu du poumon	Hydrothorax et oedème pulmonaire modérés subaigus possiblement d'origine cardiaque (dysrythmie suspectée)
T21-1536	16/03/21	Chat	Main Coon	Femelle stérilisée	2,5 ans	17/03/21	49	Naturelle	Retrouvée morte dans le jardin	Lésions compatibles avec une cardiopathie concentrique hypertrophique
T21-1665	27/03/21	Chat	Européen	Mâle castré	7 ans	29/03/21	53	Euthanasie	Maladie rénale chronique stade terminal	Tableau lésionnel en faveur d'une maladie rénale chronique
Beagle de Parasitologie	29/03/21	Chien	Beagle	Femelle	7 ans	30/03/21	54	Euthanasie	Amalgissement et anorexie sans anomalies hématologiques ou biochimiques	Tumeur intestinale (nature à déterminer à l'histologie) expliquant l'amaigrissement chronique et intussusception jéjunale segmentaire subaiguë associée à la tumeur, avec obstruction intestinale

U

Annexe 2: Essais techniques réalisés aux étapes 1 et 3 sur les temps d'incubation des spécimens soumis à la technique d'immunocytochimie.

N° Clovis	Temps de blocage de l'activité de la peroxydase endogène (Étape 1)	Temps d'incubation de l'anticorps primaire (Étape 3)
T21-239	10 minutes	30 minutes
T21-442	10 minutes	30 minutes
T16-394	15 minutes	30 minutes
T21-1088	15 minutes	30 minutes
T21-1005	10 minutes	30 minutes
T20-4334	<ul style="list-style-type: none"> - 10 minutes : CD3 / Cytokératine - 15 minutes : CD20 / Vimentine 	30 minutes
T21-1315	10 minutes	30 minutes
T21-1391	15 minutes	20 minutes
T21-1536	<ul style="list-style-type: none"> - 10 minutes : Témoin / CD3 / Cytokératine / Vimentine - 15 minutes : CD20 	30 minutes
T21-1665	15 minutes	30 minutes
Beagle de Parasitologie	15 minutes	<ul style="list-style-type: none"> - 20 minutes : Cytokératine / Vimentine - 30 minutes : CD3 / CD20

Annexe 3: Résultats généraux semi-qualitatif sur spécimens colorés au May-Grünwald Giemsa (MGG) et après réaction immunocytochimique utilisant des marqueurs de tissus épithéliaux (pan cytokératine AE1/AE3), mésenchymateux (vimentine) et lymphoïdes (CD3 et CD20)

N° clovis	Organe	Coloration et/ou marquage des lames					
		MGG	Contrôle négatif	CD3	CD20	Cytokératine (clones AE1/AE3)	Vimentine
T21-239	Rate						
	NL						
	Foie	Riche	-	- (très pauvre)	+ (rares cellules)	+ hépatocytes	+ filaments ou cytosquelettes de cellules lysées ?
T21-442	Rate	Riche	+	non interprété	non interprété	non interprété	non interprété
	NL						
	Foie						
T16-394	Rate	Riche	-	+ LT	+ LB	+ cellules rondes	+ cellules fusiformes
	NL	Riche	- (dépôts de fer noirs)	+ LT	+ LB	+ quelques cellules rondes/ovales et dépôts de fer noirs	+ cellules fusiformes (et dépôts de fer noirs)
	Foie	Pauvre	-	+	+ LB	+ hépatocytes	+ cellules fusiformes et cellules rondes
T21-1088	Rate	Riche	-	+ LT	+ LB	-	+ cellules fusiformes (Figures 16, 17)
	NL	Riche	-	+ LT (Figure 10)	+ (rares cellules) (Figures 12, 13)	+ contamination (squames et hépatocytes), et quelques cellules rondes	+ cellules fusiformes
	Foie	Pauvre, hémodilué	-	+ LT	-	+ hépatocytes	+ cellules fusiformes (et dépôts de fer noirs)
T21-1005	Rate	Riche	-		+ (rares cellules)	+ grosses cellules rondes (et bruit de fond important)	+ cellules fusiformes et cellules rondes (Figure 15)
	NL	Riche	-	+ LT	-	+ contamination par des squames uniquement	+ cellules rondes
	Foie	Riche + sang	-	+	-	+ hépatocytes	+ cellules fusiformes et cellules rondes
T20-4334	Rate	Riche	+ (lymphocytes ?)	non interprété	non interprété	non interprété	non interprété
	NL	Assez riche	-		+ LB (Figure 14)		+ cellules fusiformes et cellules rondes
	Foie	Riche	-		-		+ cellules fusiformes

NB : Les cases bleues correspondent aux lames photographiées (Figures 8 à 19).

N° clovis	Organe	Coloration et/ou marquage des lames					
		MGG	Contrôle négatif	CD3	CD20	Cytokératine (clones AE1/AE3)	Vimentine
T21-1315	Rate	Riche	+	non interprété	non interprété	non interprété	non interprété
	NL	Pauvre, hémodilué	+	non interprété	non interprété	non interprété	non interprété
	Foie	Riche	+	non interprété	non interprété	non interprété	non interprété
T21-1391	Rate	Pauvre, hémodilué	-	+ LT (Figure 8)	+ LB	+ cellules rondes à ovales	+ cellules fusiformes
	NL	Riche	-	+ LT	+ LB	-	+ cellules fusiformes
	Foie	Riche	-	+ LT	-	+ hépatocytes (Figure 19)	+ cellules fusiformes et cellules rondes (Figure 17)
T21-1536	Rate	Riche	-	+ LT (Figure 9)	+ LB	+ cellules rondes à ovales	+ cellules fusiformes et cellules rondes
	NL	Riche	-	+ LT	+ (rares cellules)	+ contamination par des squames uniquement	+ cellules fusiformes et cellules rondes
	Foie	Riche + sang	-	+	-	+ hépatocytes	+ cellules fusiformes
T21-1665	Rate	Riche	-	+ LT	+ LB (Figure 11)	+ quelques grosses cellules rondes	+ cellules fusiformes
	NL	Riche	+	non interprété	non interprété	non interprété	non interprété
	Foie	Riche	-	+ LT	+ (mais cellules abimées)	+ hépatocytes	+ cellules fusiformes et cellules rondes
Beagle de Parasitologie	Rate	Riche	-	+ LT	+ LB	+ cellules rondes à ovales	+ cellules fusiformes
	NL	Assez riche	-	+ LT	+ LB	- (mais bruit de fond important)	+ cellules rondes
	Foie	Riche	-	-	+ (rares cellules)	+ hépatocytes	+ cellules fusiformes et cellules rondes

NB : Les cases bleues correspondent aux lames photographiées (Figures 8 à 19).

NOM : FAUQUET

Prénom : Charline

TITRE : MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'IMMUNOCYTOCHIMIE POUR L'AIDE AU DIAGNOSTIC CYTOLOGIQUE DES NEOPLASIES CHEZ LE CHIEN ET LE CHAT.

RESUME : L'immunocytochimie est une technique de diagnostic apportant des informations complémentaires à la cytologie classique. Déjà largement utilisée en médecine humaine, cette technique commence à être utilisée en routine dans plusieurs laboratoires de biologie médicale vétérinaire, et permet l'immunophénotypage de tumeurs chez les carnivores domestiques. Néanmoins, des adaptations doivent être réalisées par rapport à la technique immunohistochimique, et il n'existe pas encore de méthode standardisée d'immunocytochimie, chaque laboratoire devant réaliser son propre protocole.

L'objectif de cette étude est la mise au point technique de protocoles d'immunocytochimie pour l'aide au diagnostic de néoplasies chez le chien et le chat, afin de les introduire en routine au sein du laboratoire central de biologie médicale de l'ENVT.

La première partie de cette thèse est une étude bibliographique sur les modalités de prélèvement sur tissus solides en cytologie vétérinaire et sur les principales différences observées entre techniques immunohistochimique et l'immunocytochimie.

La deuxième partie correspond à l'étude expérimentale réalisée entre janvier et juillet 2021 à partir de cytoponctions à l'aiguille fine ou par calque par impression de foie, rate, et nœud lymphatique prélevés sur des cadavres de chiens et de chats autopsiés à l'ENVT. Pour les marqueurs lymphoïdes (CD3 et CD20) et épithéliaux (Pan-cytokératine AE1/AE3), les résultats obtenus sont satisfaisants, et correspondent à ceux retrouvés dans la littérature. Néanmoins, des adaptations sont encore à réaliser pour mieux caractériser le marquage de la vimentine, marqueur mésenchymateux.

MOTS-CLES : IMMUNOCYTOCHIMIE, CD3, CD20, CYTOKERATINE, VIMENTINE, CYTOPONCTIONS A L'AIGUILLE FINE, NEOPLASIES, CHIEN, CHAT.

ENGLISH TITLE : DEVELOPMENT OF AN IMMUNOCYTOCHEMICAL TECHNIQUE TO ASSIST THE CYTOLOGICAL DIAGNOSIS OF NEOPLASIA IN DOGS AND CATS.

ABSTRACT : Immunocytochemistry is a technique used in diagnosis providing additional information to classical cytology. Already widely used in human medicine, this technique is beginning to be used routinely in several veterinary clinical pathology laboratories and allows the immunophenotyping of tumors in domestic carnivores. However, adaptations must be made with respect to the immunohistochemical technique, and there is not yet a standardized method of immunocytochemistry, each laboratory having to carry out its own protocol.

The objective of this study is the technical development of immunocytochemistry protocols to aid in the diagnosis of neoplasias in dogs and cats in order to introduce them routinely within the central laboratory of clinical pathology of the National Veterinary School of Toulouse (ENVT).

The first part of this thesis is a bibliographic study on the methods of sampling solid tissues in veterinary cytology and on the main differences observed between immunohistochemical and immunocytochemical techniques.

The second part corresponds to the experimental study carried out between January and July 2021 from fine needle aspirations or by smear prints of liver, spleen, and lymph nodes taken from dogs and cats necropsied at the ENVT.. For lymphoid (CD3 and CD20) and epithelial (Pan-cytokeratin AE1 / AE3) markers, the results obtained are satisfying and correspond to those found in the literature. Nevertheless, adaptations still need to be made to better characterize the labeling carried out by for vimentin , mesenchymal marker.

KEYWORDS : IMMUNOCYTOCHEMISTRY, CD3, CD20, CYTOKERATINE, VIMENTINE, FINE NEEDLE ASPIRATION, NEOPLASIA, DOG, CAT.